



Universidad
Carlos III de Madrid
www.uc3m.es

TESIS DOCTORAL

Producción y Caracterización de Composites Mg-HAP Biocompatibles

Autor:

Rubén del Campo Muqa

Director/es:

Begoña Savoini Cardiel

Angel Muñoz Castellanos

Tutor:

Begoña Savoini Cardiel

DEPARTAMENTO DE FISICA

Leganés, febrero de 2017



TESIS DOCTORAL

Producción y Caracterización de Composites Mg-HAP Biocompatibles

Autor: *Rubén del Campo Muga*

Director/es: Begoña Savoini Cardiel

Angel Muñoz Castellanos

Firma del Tribunal Calificador:

Firma

Presidente: Carmen Inés Ballesteros Pérez

Vocal: Alejandro Ureña Fernández

Secretario: Pablo Pérez Zubiaur

Calificación:

Leganés, 21 de febrero de 2017

Agradecimientos

Primeramente quería agradecer a toda la gente del departamento de Física de la Universidad Carlos III de Madrid por la oportunidad que me dieron hace 4 años, concediéndome una beca PIF para la realización de esta tesis. En especial a mis directores Dra. Begoña Savoini y Dr. Angel Muñoz, porque sin su esfuerzo, apoyo y dedicación no hubiese sacado adelante los resultados. También quería agradecer al Dr. Miguel Angel Monge su ayuda con las medidas de textura, microscopía y algún que otro viaje al Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas, al Prof. Ramiro Pareja por ayudarme en la comprensión de las propiedades mecánicas y al Dr. Ricardo Domínguez por dejarme participar en sus clases de Máster dando alguna charla.

Gracias de nuevo a la Universidad Carlos III de Madrid y al Instituto Álvaro Alonso Barba por las ayudas que me concedieron para la realización de dos estancias en el extranjero. Muchas gracias a la gente del departamento de Saude Ambiental del Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge en Lisboa por la buena acogida y buen ambiente que tuve mientras realizaba los experimentos de biocompatibilidad, en especial a mi supervisora Dra. Luisa Jordao. Igualmente a la gente del laboratorio de STM de la Universidad de Manchester por la ayuda y compañerismo que tuve durante los estudios de superficie, en especial a mis supervisores Dr. Robert Lindsay y Dr. Hadeel Hussain. Muchas gracias al Dr. Gerardo Garcés del CENIM por las facilidades que nos dio para la preparación de algunos de los materiales, ensayos de compresión y las conversaciones y buen rollo durante el congreso en Corea.

A mis amigos de siempre de Zamora, amigos de Madrid, de Químicas, de Ingeniería de Materiales, del Máster y como no, a todos los amigos y compañeros de despacho que estaban al principio de la tesis o se han ido incorporando durante estos últimos 4 años. En especial a Jorge Alcusón con el que he compartido despacho todo el tiempo, mesa con

mesa, y nos hemos soportado mutuamente tanto en los buenos momentos como en otros de locura y más complicados.

A la gente que me animó a hacer y continuar en la carrera investigadora, tanto en las prácticas durante la carrera en el departamento de Cromatografía y Espectrometría del Instituto de Química Física Rocasolano, Dra. Rosa Lebrón y Dr. Jesús Eduardo Quintanilla; en el proyecto de fin de carrera de Ingeniería de Materiales en el departamento de Física de Materiales de la Universidad Complutense de Madrid, Dra. Ana Urbieto y Dra. Paloma Fernández; y en el trabajo de fin de Master en el grupo de Electrocerámicas del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, Dr. Harvey Amorín y Dra. Alicia Castro.

Este logro como todo lo que voy consiguiendo en la vida se lo debo a mi familia, principalmente a mi madre y a mi abuela que me permiten llevar esta vida, escuchan las cosas que les digo y hacen como que es muy interesante, animándome a continuar.

Indice

<i>Resumen</i>	1
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	3
1.1. PROBLEMÁTICA	5
1.2. MAGNESIO	6
1.3. HIDROXIAPATITA.....	8
1.4. MATERIAL COMPUESTO	9
1.5. PULVIMETALURGIA.....	10
1.6. OBJETIVO	10
CAPÍTULO 2: TÉCNICAS EXPERIMENTALES	13
2.1. MATERIALES	15
2.2. PROCESADO DE POLVOS	15
2.2.1. <i>Mezclado</i>	16
2.2.2. <i>Compactación</i>	16
2.2.3. <i>Consolidación</i>	18
2.2.4. <i>Procesado por ECAP</i>	19
2.2.4.1. Principio.....	19
2.2.4.2. Rutas.....	20
2.2.4.3. Deformación acumulada	21
2.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES	23
2.3.1. <i>Densidad</i>	23
2.3.2. <i>Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)</i>	24
2.3.2.1. Preparación de las muestras	24
2.3.2.2. Microscopía Óptica.....	25
2.3.2.3. Microscopía SEM	25
2.3.3. <i>Difracción de Rayos-X</i>	27

2.3.4. Medidas de macrotextura	27
2.4. PROPIEDADES MECÁNICAS	28
2.4.1. Microdureza	28
2.4.2. Ensayos de Compresión.....	29
2.5. COMPORTAMIENTO A LA CORROSIÓN	31
2.5.1. Método a pH constante	32
2.5.1.1. Preparación de las muestras, electrolito y disoluciones	32
2.5.1.2. Procedimiento experimental.....	33
2.5.2. Método de formación de Hidrógeno.....	34
2.5.2.1. Preparación de las muestras y de los electrolitos	34
2.5.2.2. Procedimiento experimental.....	35
2.6. CITOTOXICIDAD	36
2.6.1. Preparación de muestras, medios de cultivo y tipos de células	37
2.6.2. Procedimiento	39
2.6.3. Tratamiento de datos.....	40
2.6.4. Microscopía Confocal.....	40
2.6.4.1. Preparación de las muestras	40
2.7. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS.....	41
2.7.1. Preparación de las muestras y bacterias	42
2.7.2. Procedimiento	42
2.7.3. Tratamiento de datos.....	43
 CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN MICROESTRUCTURAL	45
3.1. CARACTERIZACIÓN DEL POLVO	47
3.1.1. Difracción de rayos-X	47
3.1.2. Tamaño de partícula	50
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES CONSOLIDADOS.....	51
3.2.1. Densidad.....	51
3.2.2. Difracción de rayos-X	52
3.2.3. Microscopía Óptica	55
3.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	60
3.2.5. Macrotextura	65

CAPÍTULO 4: PROPIEDADES MECÁNICAS	71
4.1. MICRODUREZA.....	73
4.2. ENSAYOS DE COMPRESIÓN	78
4.2.1. <i>Endurecimiento</i>	83
4.2.2. <i>Maclado</i>	91
4.2.3. <i>Caracterización de la superficie de fractura</i>	92
 CAPÍTULO 5: COMPORTAMIENTO A LA CORROSIÓN	 93
5.1. CORROSIÓN EN NaCl: MÉTODO A PH CONSTANTE	95
5.2. CORROSIÓN EN MEDIOS BIOLÓGICOS: MÉTODO DE EVOLUCIÓN DE H ₂	103
5.2.1. <i>Electrolito Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>	103
5.2.1.1. Caracterización de la interfase Composite - Mg(OH) ₂	115
5.2.2. <i>Electrolitos basados en medios de cultivo celulares</i>	118
 CAPÍTULO 6: CITOTOXICIDAD Y FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i>	 123
6.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD METABÓLICA.....	125
6.2. MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS.....	131
6.3. FORMACIÓN DE <i>BIOFILMS</i>	133
 CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES	 137
7.1. TRABAJO FUTURO	142
 <i>Referencias</i>	 143

Resumen

El objetivo de esta tesis es la obtención y caracterización de materiales biocompatibles que posean propiedades mecánicas similares a las del hueso.

Los implantes médicos al introducirlos en el cuerpo durante periodos largos de tiempo pueden provocar ciertos problemas para el organismo. En los casos en que la reparación del tejido se produce en un cierto tiempo es suficiente el empleo de implantes temporales. Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones el implante queda en el interior por no realizar una segunda intervención para extraerlo.

El hecho de que actualmente se usen los mismos materiales para implantes permanentes y temporales, hace que la ciencia avance en la búsqueda de nuevos materiales que posean propiedades específicas para su uso como implantes temporales.

Los materiales basados en Mg son muy interesantes para la fabricación de este tipo de implantes relacionados con la reparación del hueso debido a que presentan unas propiedades mecánicas similares a las del hueso, una alta biocompatibilidad y son biodegradables. No obstante, el magnesio presenta una velocidad de corrosión muy elevada en medio fisiológico. Por otra parte, la hidroxiapatita (HAP) se presenta como un candidato muy prometedor para sustituto del hueso. Sin embargo, sus malas propiedades mecánicas han limitado su uso a un número muy reducido de aplicaciones. El objetivo de este trabajo es la obtención de materiales compuestos de Mg e HAP biocompatibles, que posean propiedades mecánicas adecuadas y control de la resistencia frente a la corrosión.

Los materiales a desarrollar se fabricaron siguiendo una ruta pulvimetalúrgica mediante la mezcla de los componentes, la compactación isostática en frío y su consolidación por extrusión. A algunos materiales, una vez consolidados, se les aplicó un tratamiento termo-mecánico mediante

ECAP para modificar su microestructura por refinamiento de grano y homogeneización de las partículas de HAP en el material.

Se realizaron estudios de caracterización microestructural, propiedades mecánicas, comportamiento frente a la corrosión y biocompatibilidad, los cuales se van a desarrollar a lo largo de la tesis en los diferentes capítulos:

- El capítulo 1 presenta la problemática asociada a los implantes y la razón de los materiales que se han elegido para el desarrollo de la tesis.
- El capítulo 2 muestra las técnicas y métodos experimentales utilizados durante la tesis.
- El capítulo 3 contiene los resultados de caracterización microestructural tanto de los polvos de partida como de los materiales consolidados.
- El capítulo 4 incluye los resultados acerca de las propiedades mecánicas de los materiales.
- El capítulo 5 contiene los resultados obtenidos a partir del comportamiento frente a la corrosión de los materiales.
- El capítulo 6 incluye los resultados sobre biocompatibilidad, en concreto de los ensayos de citotoxicidad y formación de *biofilms*.
- El capítulo 7 muestra las principales conclusiones obtenidas e ideas de continuación del trabajo.

Capítulo 1: Introducción

1.1. Problemática

Los implantes médicos se pueden clasificar en permanentes y temporales, dependiendo del tiempo que van a estar desempeñando su función. Los implantes permanentes sustituyen un tejido o una parte de tejido y estarán desempeñando su función durante toda la vida del organismo. Sin embargo, los implantes temporales desempeñan su función únicamente durante el tiempo en el que el tejido está en proceso de reparación. Actualmente, tanto para unos implantes como para los otros, se utilizan los mismos materiales. Principalmente, se utilizan: acero inoxidable 316 L, aleaciones de Cobalto-Cromo, aleaciones de Titanio y Titanio puro comercial ((Chen y Thouas 2015) (Elias, y otros 2008)).

Los metales, que en general poseen buenas propiedades mecánicas y resistencia a la fractura, siempre han sido los principales candidatos para usarse como biomateriales en reparaciones óseas. A pesar de estas buenas propiedades, presentan el inconveniente de tener un elevado módulo elástico, lo que origina una distribución no uniforme de las cargas en el hueso, provocando *stress shielding*, (Torres, y otros 2014). El efecto de *stress shielding* ocurre cuando existe mucha diferencia entre las propiedades mecánicas del hueso y del implante, siendo el implante el que va a soportar toda la carga, mientras que el hueso dejará de recibir estímulo para desempeñar su función, produciéndose mayor resorción ósea y un aumento de la separación hueso-implante. Otro problema que pueden presentar los metales al utilizarse como biomateriales es que pueden liberar, bien productos como consecuencia del desgaste al soportar la carga y encontrarse en posiciones con cierto movimiento, o bien productos de corrosión debidos a reacciones químicas con el entorno del implante, los cuales pueden ser tóxicos para el organismo (Madl, y otros 2015).

En el caso de los implantes permanentes, estos problemas se solucionan con la extracción y sustitución del implante por uno nuevo con variaciones en la forma, lo que implica una segunda operación en el paciente. En el caso de los implantes temporales, existen dos opciones: se puede realizar una segunda operación para extraer el implante una vez que

el tejido se ha reparado, o dejarlo dentro del organismo para toda la vida. En cualquier caso, si se extrae una vez el tejido está reparado, puede haber complicaciones que causen nuevo daño en el tejido. En el caso de dejarlo dentro, las consecuencias pueden ser las mismas que en los implantes permanentes, *stress shielding* o la aparición de productos tóxicos como consecuencia de la corrosión.

Por lo tanto, sería interesante para este campo el uso de materiales que no desgastaran el hueso ni produjeran compuestos tóxicos para el organismo. En el caso de los implantes temporales, lo ideal sería que los materiales desaparecieran en el organismo una vez cumplida su función, sin necesidad de una segunda operación para proceder a su extracción.

1.2. Magnesio

El magnesio es un metal que posee unas propiedades mecánicas parecidas al hueso natural, y en general, posee un módulo elástico y una densidad muy inferior a los de los otros metales utilizados usualmente para los implantes (Tabla 1.1). Además de ser biodegradable, está presente en muchas reacciones metabólicas en el organismo (Zysset, y otros 1999), lo que lo hace biocompatible. Todas estas características hacen del magnesio el candidato ideal para los implantes.

La primera persona que aisló este metal fue Sir Humphrey Davy, químico británico, a partir de la descomposición de sulfato de magnesio por electrolisis en 1808. En 1833, Michael Faraday, discípulo del anterior y también usando la técnica de electrolisis lo aisló a partir del cloruro de magnesio. En 1852, Robert Bunsen, en un pequeño laboratorio, empezó la producción comercial de magnesio (Witte 2010).

Propiedad	Hueso natural	Mg	316 L	Co-Cr	Ti puro	TiAl ₆ V ₄
Densidad (g/cm ³)	1.8-2.1	1.7	8.0	8.4	4.5	4.4
Módulo Elástico (GPa)	3-20	45	200	200-230	105	110

Tabla 1.1. Densidad y módulo elástico en valor medio del hueso natural, Mg y materiales más utilizados como implantes.

Gracias a su baja densidad, el magnesio se ha utilizado desde siempre para producir aleaciones muy ligeras. Y es por ello que durante mucho tiempo se ha asociado a la industria aeroespacial y de transporte, para las que aligerar el peso de las piezas es el factor más importante. El principal inconveniente que presenta este elemento y sus aleaciones, razón que ha limitado su empleo, es su baja resistencia a la corrosión. El magnesio suele alearse con otros elementos también ligeros, como el aluminio o el zinc. Cuando se alea con aluminio, en una concentración de aluminio inferior al 4% atómico se forma el compuesto intermetálico β -MgAl que actúa como barrera a la corrosión (Atrens, y otros 2013). Desafortunadamente, en el campo de la biomedicina, su empleo no es adecuado, ya que el aluminio posee un efecto tóxico en el organismo. Si para las aleaciones de magnesio se controlan las impurezas y los cambios en la microestructura, se pueden mejorar las propiedades del material, consiguiendo un material biocompatible con una velocidad de degradación suficientemente baja que proporcione un tiempo aceptable para que el tejido se recupere y no genere productos de corrosión tóxicos.

El control de la corrosión sería lo ideal para la producción de implantes temporales con diferentes propiedades en función de las necesidades de cada tipo de operación y de cada paciente.

En el campo de la industria biomédica, en sus inicios ya se utilizó el magnesio puro. Pero al obtenerse resultados dispares, su uso fue disminuyendo a lo largo de los años. Actualmente, debido al auge de investigación y desarrollo de nuevos materiales, es uno de los principales candidatos como materiales para usos en implantes temporales (Witte 2010).

1.3. Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAP) es un material cerámico, de composición química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Es la misma composición que el componente inorgánico de los huesos y dientes (Olszta, y otros 2007) y es por esto que, durante mucho tiempo, la obtención de HAP fue mediante la calcinación de huesos. Actualmente, existen numerosas formas de obtención por diferentes vías y usando diferentes precursores (Orlovskii, Komlev y Barinov 2002).

La hidroxiapatita, además de tener la composición inorgánica de los huesos, posee bioactividad con el tejido óseo, es decir, puede interactuar químicamente con éste, y en las condiciones apropiadas, funcionar como puntos de nucleación para la regeneración de hueso (Rossi, y otros 2012). Con estas cualidades, este compuesto ya se está utilizando como biocerámica y tiene gran interés en ser investigado como regenerador de tejido óseo. Aunque en este campo en un principio se empezó usando otros compuestos de la familia de las apatitas, no es hasta principios de la década de los 80 cuando se empieza a usar HAP en forma de gránulos para cirugía maxilofacial.

Actualmente, la hidroxiapatita se utiliza ampliamente en el mercado de los implantes, ya sea en implantes producidos íntegramente con HAP o en alguna de sus partes. En muchas ocasiones, implantes fabricados con

otros materiales son recubiertos con HAP para proporcionarles una mejor osteoconducción y bioactividad.

En estos implantes recubiertos se están llevando a cabo estudios para mejorar sus propiedades en función de su rugosidad, el grosor del recubrimiento, pureza y cristalinidad de la HAP. Todos estos factores dependen en gran medida del método de aplicación del recubrimiento, del tipo de sustrato, es decir, del material sobre el que va a colocarse el recubrimiento y del método de obtención de la HAP (Asri, y otros 2016).

Por último, también se están haciendo estudios de materiales compuestos, con una fase de HAP y otra fase que suele ser de naturaleza metálica o polimérica (Chaudhuri, y otros 2016).

1.4. Material Compuesto

Un material compuesto está formado por dos o más componentes, uno de los componentes actúa como matriz del material o fase continua, y los otros actúan como refuerzo o fase dispersa. En el caso de esta tesis, los materiales a estudio estarán formados por matriz de magnesio y refuerzo de partículas de HAP.

La combinación de los dos componentes permite aprovechar las características de ambos elementos. Por un lado las excelentes propiedades mecánicas del Mg, metal de baja densidad y con módulo elástico próximo al del hueso, y por otro lado las partículas de hidroxapatita, que además de dar estabilidad al implante mientras se produce su degradación en el organismo, actúan como puntos de nucleación para la formación de nuevo hueso, gracias a su elevada bioactividad, acelerando la recuperación del tejido.

El estudio de la combinación de estos componentes permitirá producir materiales con propiedades y características diferentes, que podrían emplearse en aplicaciones diversas. La situación ideal sería poder construir materiales con las propiedades adecuadas para cada paciente, en función del tipo de implante, datos del paciente, tiempo necesario para la recuperación, etc...

1.5. Pulvimetalurgia

Consiste en un proceso de fabricación que parte de los materiales en polvo, donde primero se suele producir un compactado para posteriormente un sinterizado. En aleaciones, como por ejemplo aceros, se consiguen composiciones químicas más homogéneas que por otras rutas, como en el caso de producción por colada donde puede haber problemas de variación de composición entre las paredes del molde y el centro del lingote y formación de segregados. Generalmente, la etapa de compactado se realiza a temperatura ambiente y la etapa de sinterizado o consolidado se lleva a cabo a elevadas temperaturas y/o presiones.

1.6. Objetivo

El objetivo de esta tesis es la producción y caracterización de materiales compuestos de Mg-HAP biocompatibles.

Todos los materiales se producirán por ruta pulvimetalúrgica con consolidación mediante extrusión. Se utilizarán diferentes proporciones de los componentes. Para la fase dispersa de partículas de HAP se utilizarán

dos tamaños distintos. Algunos de los materiales producidos se someterán a un tratamiento termo-mecánico de ECAP (*Equal Channel Angular Pressing*), con el objetivo de refinar el tamaño de grano.

Se analizará la microestructura de los materiales y se estudiarán sus propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión en diferentes medios y la biocompatibilidad.

Como conclusión se obtendrá la relación entre las propiedades de los materiales, su microestructura y el procesado que se ha utilizado para su obtención.

Capítulo 2: Técnicas Experimentales

2.1. Materiales

Para este trabajo de investigación se han producido materiales compuestos de matriz metálica de Mg y refuerzo de partículas de HAP. La composición ha sido Mg-x%HAP, con $x=5, 10$ y 15 (porcentaje en peso). Los materiales se han procesado mediante una ruta pulvimetalúrgica consistente en mezclar los polvos originales y ulterior consolidación mediante extrusión a $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. El polvo de Mg, suministrado por la marca “Alfa Aesar”, posee una pureza del 99.8% y un tamaño medio de partícula de $38\text{ }\mu\text{m}$. Se utilizaron polvos de HAP con dos tamaños medios de partícula: $25\text{ }\mu\text{m}$, suministrado por la marca “Berkeley Advanced Biomaterials” (L-HAP) y $6\text{ }\mu\text{m}$ suministrado por la marca “Plasma Biototal Limited” (S-HAP). Los materiales fabricados a partir de HAP de $25\text{ }\mu\text{m}$ se denotarán como “L-xHAP” y los materiales fabricados a partir de HAP de $6\text{ }\mu\text{m}$ se denominarán como “S-xHAP”. El valor de x corresponde al porcentaje en peso de HAP en el material, es decir 5, 10 ó 15.

Muestras de L-xHAP se sometieron a un tratamiento termo-mecánico, *Equal Channel Angular Pressing* (ECAP), con el fin de analizar su efecto en el tamaño y forma del grano y en la homogeneización y dispersión de las partículas de HAP en la matriz. La familia de materiales así producidos se denominará “LE-xHAP”.

2.2. Procesado de Polvos

La ruta pulvimetalúrgica seguida para la producción de los materiales tiene tres etapas: mezcla de los polvos iniciales, compactación en frío mediante *Cold Isostatic Pressing* (CIP) y consolidación por extrusión.

2.2.1. Mezclado

La preparación previa de los materiales se llevó a cabo en una cámara de guantes en atmósfera de Argón. La mezcla se realizó en una mezcladora Turbula T2F (Figura 2.1) a una velocidad de 101 r.p.m. durante 6 horas, con el fin de obtener una buena dispersión y homogeneización de los polvos.



Figura 2.1. Mezcladora automática Turbula T2F utilizada en la etapa de mezclado.

2.2.2. Compactación

En la cámara de guantes y en atmósfera de Argón, los polvos mezclados se introdujeron en moldes de silicona. Los moldes de silicona, con forma cilíndrica, se fabricaron con “Ferocast Silicastic 3481” y “agente

de curado 81". Los moldes se compactaron en una prensa hidrostática EPSI (Figura 2.2) con taladrina (mezcla de agua y aceite) a temperatura ambiente, alcanzándose una presión máxima de 250 MPa, que se mantuvo durante 5 minutos. Tras la compactación el molde experimentó una reducción de sección de aproximadamente un 4%.



Figura 2.2. Prensa hidrostática utilizada en la etapa de compactado.

Las muestras compactadas tenían forma cilíndrica de tamaño muy similar al del depósito de la extrusora. Las pequeñas imperfecciones se eliminaron mediante un torno.

2.2.3. Consolidación

La consolidación se realizó mediante extrusión utilizándose dos máquinas diferentes. La primera de ellas es una prensa horizontal con capacidad máxima de presión de 19000 MPa perteneciente al CENIM-CSIC. Los materiales L-xHAP se consolidaron en esta prensa a 400 °C, con una reducción de sección de 11:1 y a una velocidad de 2 mm/s, excepto el material de Mg puro, L-Mg, que se consolidó a 350 °C con una reducción de sección de 17:1.

El segundo equipo es una máquina de ECAP de la marca y modelo “Microtest-EACC/400” con modificación de las matrices y del pistón para que funcione como una extrusora (Figura 2.4). Los materiales S-xHAP se sinterizaron en este equipo a una temperatura de extrusión de 400 °C. La reducción de sección fue de 10:1 y la velocidad utilizada fue de 0.5 mm/s. En este equipo la temperatura de extrusión se mide directamente en las matrices de la máquina, lo que permite un mayor control de la temperatura.

En todos los casos, tras la extrusión, los especímenes eran barras largas cilíndricas de 1 cm de diámetro (Figura 2.3). Algunos materiales presentaban grietas superficiales perpendiculares a la dirección de extrusión.



Figura 2.3. Ejemplo de una barra extruida. La figura se corresponde con una de las barras S-xHAP.

2.2.4. Procesado por ECAP

A los materiales tipo L-xHAP se les realizó un procesado termomecánico ECAP para modificar la microestructura y homogeneizar las partículas de HAP en la matriz. Las muestras a procesar por ECAP tenían forma cilíndrica de 8 mm de diámetro y 120 mm de longitud. Este procesado consistió en someterlas a 4 pasadas siguiendo la ruta B_C , a 300 °C, y con una velocidad de 0.5 mm/s. La geometría del canal es cilíndrica de 8 mm de diámetro y con un ángulo de 105°. En la ruta B_C , al pasar de una pasada a la siguiente, la muestra se gira 90° a lo largo del eje de extrusión siempre en el mismo sentido. La máquina utilizada fue la “Microtest EACC/400”. En la figura 2.4 se muestran imágenes de la máquina utilizada para los ensayos ECAP y las matrices utilizadas.



Figura 2.4. Máquina de ECAP, matriz y pistón utilizados.

2.2.4.1. Principio

En esencia, el proceso de ECAP consiste en una extrusión en la que se mantiene constante la sección de la pieza y se usa un canal con un cierto ángulo. El material, en lugar de ser forzado a pasar por el dado de extrusión y disminuir su sección, es forzado a pasar por el ángulo, consiguiéndose grandes deformaciones microestructurales. Este procesado fue inventado

por V. M. Segal durante su tesis en 1972 (Segal 1999). Al pasar por el canal, lo que implica una buena lubricación de la pieza, el material se deforma sin alterar sus dimensiones, lo que permite que la muestra se pueda pasar repetidas veces sin operaciones previas. La deformación plástica de la pieza es por cizalladura simple en el plano del ángulo. Varios estudios han demostrado que la microestructura deja de refinarse a partir de un cierto número de pasadas (Ferrasse, y otros 2004).

2.2.4.2. Rutas

Como se ha mencionado, la principal ventaja de este tipo de procesamiento es que los materiales conservan sus dimensiones, haciendo posible la variación en el número de pasadas y giros de la probeta de una pasada a la siguiente, lo que da lugar a una gran diversidad de microestructuras. Existen 4 rutas principales:

Ruta A: no se gira la pieza entre cada pasada y se introduce en el canal siempre en el mismo sentido.

Ruta B_A: se gira la pieza 90° entre cada pasada alternando el sentido de giro.

Ruta C: se gira la pieza 180° entre cada pasada.

Ruta B_C: se gira la pieza 90° entre cada pasada y siempre en el mismo sentido.

También existen combinaciones de estas rutas tal y como se puede observar en la figura 2.5.

Route	Number of pressings						
	2	3	4	5	6	7	8
A	0°	0°	0°	0°	0°	0°	0°
B _A	90° ↶	90° ↷	90° ↶	90° ↷	90° ↶	90° ↷	90° ↶
B _C	90° ↶	90° ↶	90° ↶	90° ↶	90° ↶	90° ↶	90° ↶
C	180°	180°	180°	180°	180°	180°	180°
B _A -A	90° ↶	0°	90° ↷	0°	90° ↶	0°	90° ↷
B _C -A	90° ↶	0°	90° ↶	0°	90° ↶	0°	90° ↶

Figura 2.5. Giros de la muestra con las diferentes rutas. (Furukawa, y otros 1998)

2.2.4.3. Deformación acumulada

Se puede demostrar que al disminuir el ángulo del canal se producen mayores deformaciones. Sin embargo, el mayor efecto en el refinamiento de grano se va a producir al aumentar el número de pasadas con la ruta elegida. En la figura 2.6 se observa la deformación producida en un elemento cúbico al pasar por un canal de 90° en función de la ruta, el plano de observación y el número de pasadas.

Route	Plane	Number of pressings								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
A	X									
	Y									
	Z									
B _A	X									
	Y									
	Z									
B _C	X									
	Y									
	Z									
C	X									
	Y									
	Z									
B _A -A	X									
	Y									
	Z									
B _C -A	X									
	Y									
	Z									

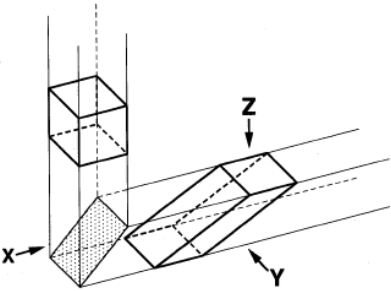


Figura 2.6. Deformación del grano en una pieza cúbica en función de la ruta, plano de la pieza y número de pasadas y ejemplo de la primera pasada.

2.3. Caracterización de los materiales

2.3.1. Densidad

La densidad de los materiales consolidados se ha determinado mediante la técnica de picnometría de Helio con un equipo automático “Ultrapycnometro 1000 (Quantrachrome Instruments)”. El funcionamiento del equipo se basa en el principio de Arquímedes y en la ley de Boyle de los gases ideales (Figura 2.7).



Figura 2.7. Ultrapicnómetro utilizado junto con las bolas de calibración.

El grado de densificación se ha estimado mediante el cociente entre la densidad experimental y la teórica calculada. La densidad teórica se

obtiene a partir de la densidad de cada uno de los componentes aplicando la regla de las mezclas (Ecuación 2.1):

$$\rho_{teorica} = \frac{100 \cdot \rho_{Mg} \cdot \rho_{HAP}}{(100-x)\rho_{HAP} + x\rho_{Mg}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

donde ρ_{Mg} : 1.738 g/cm³, ρ_{HAP} = 3.110 g/cm³ y x es el porcentaje de HAP en el material.

2.3.2. Microscopía Óptica y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

2.3.2.1. Preparación de las muestras

Para analizar la microestructura tanto por microscopía óptica como por microscopía electrónica de barrido, es necesario preparar adecuadamente la superficie de las muestras. Los pasos requeridos para la preparación han sido:

Corte, desbaste y pulido

Las probetas se cortaron, tanto en sección longitudinal (paralela a la dirección de extrusión) como en sección transversal. Para ello se utilizó una sierra circular automática “Struers Secotom-10”.

En primer lugar se procedió al desbaste de las probetas para eliminar las rugosidades producidas durante el corte. Posteriormente se llevó a cabo un pulido mecánico convencional con papel de SiC P600 y P1000 y se finalizó con un pulido con soluciones acuosas de partículas de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ de 1 μm y de 0.3 μm , lo que nos permitió obtener una superficie a espejo.

Ataque químico

Para revelar la microestructura de las muestras se realizaron pruebas con diferentes reactivos. Finalmente el reactivo más efectivo para estudios en microscopía óptica fue la mezcla de 1.5 g de ácido pícrico, 25 ml de etanol, 5 ml de ácido acético y 10 ml de agua destilada. El ataque se realizó sumergiendo las muestras durante 5 s y cortando la reacción primero con etanol ligeramente caliente y posteriormente con chorro de agua fría. Inmediatamente las probetas se secaron con chorro de aire a presión. Para los análisis mediante SEM, el ataque más efectivo resultó ser una mezcla de ácido nítrico/ácido clorhídrico/etanol en proporciones 1:2:7 durante un tiempo de 2 s. La reacción se cortó primero con chorro de etanol y posteriormente con chorro de agua fría. Por último las probetas se secaron con chorro de aire a presión.

2.3.2.2. Microscopía Óptica

Para la obtención de las imágenes se utilizó un microscopio “Nikon Eclipse ME600” dotado con una cámara digital “Progres SpeedXT core5-Jenoptik”.

2.3.2.3. Microscopía SEM

Para la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido se utilizaron dos equipos. Un microscopio “Philips XL 30”, con filamento de wolframio y con emisión termoiónica, y un microscopio “FEI - Teneo”, con punta de wolframio y con emisión de campo.

Ambos microscopios disponen de dos detectores, uno de electrones retrodispersados (*Back-Scattered Electrons*) y otro de electrones secundarios (*Secondary Electrons*). El primero nos permite visualizar zonas con diferente contraste en función del número atómico promedio de la fase observada, es decir, la composición; el detector de electrones secundarios, en cambio, muestra contraste en función de la topografía de la muestra.

Los dos microscopios disponen también de espectrómetro de dispersión de energía de Rayos X, EDX, para realizar análisis composicional.

El microscopio “FEI - Teneo” (Figura 2.8) además de permitir la detección separada de electrones emitidos en diferentes ángulos, posee dos detectores adicionales situados en la propia columna del microscopio que se pueden combinar, facilitando la obtención de imágenes de alta resolución a distancias de trabajo muy pequeñas, entre 2 y 5 mm.

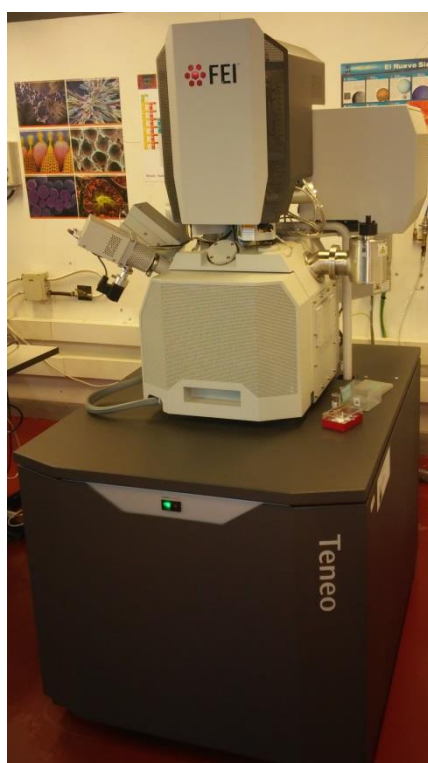


Figura 2.8. Microscopio electrónico de barrido “FEI – Teneo”.

2.3.3. Difracción de Rayos-X

Los polvos iniciales y los materiales ya consolidados se caracterizaron mediante la técnica de difracción de rayos-X, lo que nos permitió determinar las fases presentes en el material y estudiar las orientaciones preferenciales (textura) que pudieran aparecer durante el procesado. Se obtuvieron difractogramas de muestras tanto en sección transversal como longitudinal a la dirección de extrusión.

Los rayos-X son difractados por los planos atómicos de la red cristalina, siguiendo la ley de Bragg (Ecuación 2.2):

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin(\theta) \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Siendo n el orden de difracción, λ la longitud de onda del haz incidente de rayos-X, d_{hkl} el espaciado entre los planos atómicos cuyos índices de Miller son los valores hkl y θ el ángulo de incidencia del haz de rayos-X con respecto a los planos atómicos.

Se ha empleado un difractómetro automático “Philips modelo X’Pert”, con cátodo de Cu ($\lambda_1=1.54056 \text{ \AA}$, $\lambda_2=1.54439 \text{ \AA}$). Los espectros experimentales se analizaron mediante el ajuste Rietveld, usando el software Fullproff desarrollado por J. Rodríguez-Carvajal (Rodríguez-Carvajal 1993).

2.3.4. Medidas de macrotextura

La textura cristalográfica se define como el estudio de la distribución de las orientaciones de los cristales que forman una muestra. En un monocristal, se obtendría una única orientación. En un policristal, donde cada grano tendría una orientación diferente respecto a los otros granos, la textura consiste en determinar la distribución de las orientaciones de los diferentes granos.

Los materiales a estudiar se produjeron por ruta pulvimetalúrgica, como ya se ha mencionado. El polvo inicial estaba constituido por partículas policristalinas con granos que globalmente estaban orientados en direcciones aleatorias. Durante el proceso de fabricación por extrusión y procesado por ECAP se favorece el alineamiento de los granos del material induciéndose cierta dirección preferencial o textura, la cual va a influir en las distintas propiedades. Estas direcciones preferenciales se pueden observar a priori mediante las medidas de difracción de rayos-X estudiando las intensidades relativas de los diferentes picos de Bragg.

Las medidas de macrotextura se realizaron en un difractómetro modelo “Siemens D5000” (CENIM-CSIC) con cátodo de cobre, y equipado con anillo central de Euler con barrido en X-Y que permite la rotación de la muestra en dos ejes. Las medidas se realizaron en la sección transversal en muestras pulidas a espejo con un espesor mínimo de 2 mm.

A partir de estas medidas de difracción se calcularon las figuras de polos y la función de distribución de orientaciones relacionadas con diferentes familias de planos ($h\ k\ l\ i$).

2.4. Propiedades mecánicas

2.4.1. Microdureza

La microdureza Vickers de los materiales consolidados se ha medido mediante un microdurómetro modelo “Future Tech FM-100e” (Figura 2.9) aplicando una carga de 9.81 N durante 20 s. Se han llevado a cabo medidas tanto en muestras cortadas en la dirección longitudinal como en la transversal. El valor de la microdureza para cada material se obtuvo a partir del valor promedio de 10 medidas. Se utilizó un microscopio óptico para

examinar la huella producida y medir los valores de las diagonales de la huella. El valor de la microdureza H_V se obtuvo a partir de la ecuación 2.3:

$$H_V = 1.854 \cdot \frac{P}{d_1 \cdot d_2} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

donde d_1 y d_2 son las longitudes de las diagonales expresadas en mm y P es la carga aplicada expresada en Kgf. No obstante, los valores de microdureza se expresarán en MPa.



Figura 2.9. Microdurómetro Future Tech FM-100e.

2.4.2. Ensayos de Compresión

Un ensayo de compresión consiste en estudiar la deformación originada en una muestra cuando se le aplica una tensión uniaxial de compresión. Se suelen aplicar a materiales que van a trabajar en condiciones de compresión o a metales frágiles que en ensayos de tensión se rompen a tensiones por debajo del *Yield Strength*. A partir de la

representación gráfica de los valores de tensión de compresión frente a deformación, se obtienen valores característicos del material como el *Yield Strength* (YS), la *Ultimate Compressive Strength* (UCS) y la deformación plástica uniforme (ε_{plast}^u).

Los ensayos se realizaron en una máquina de tracción-compresión “Shimadzu AG-I” (Figura 2.10) siguiendo la norma “ASTM International E9-89^a: Standard Test Methods of Compression Testing of Metallic Materials at Room Temperature”. La máquina empleada tiene control en el desplazamiento de los platos de compresión y se usó una celda de compresión de 50 kN. La velocidad de deformación fue de 10^{-4} s^{-1} .

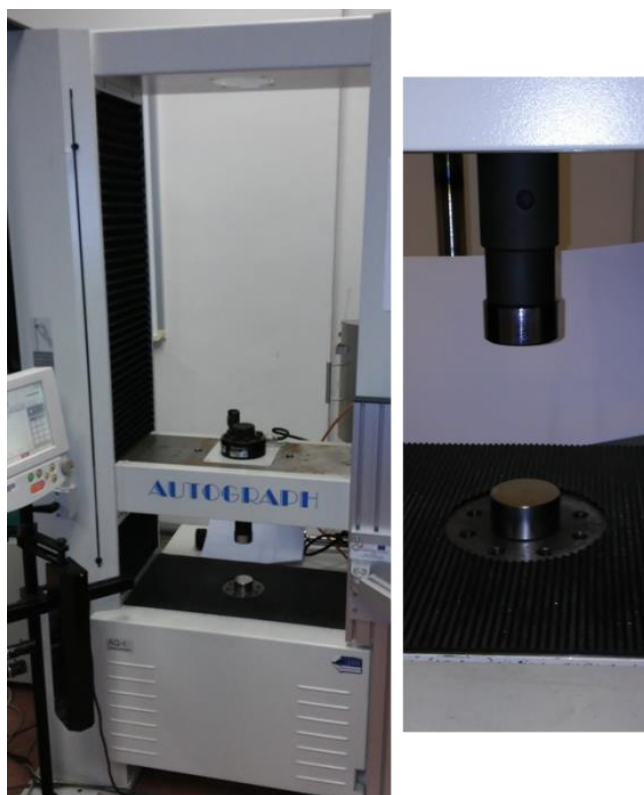


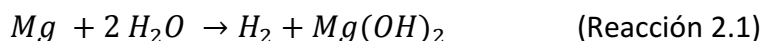
Figura 2.10. Máquina utilizada para ensayos de compresión y platos.

Las probetas de compresión utilizadas fueron mecanizadas en forma cilíndrica, siendo el eje cilíndrico paralelo a la dirección de extrusión. Las dimensiones de las probetas eran 6 mm de diámetro y 10.5 mm de longitud. La contribución de la máquina se eliminó con el uso de un extensiómetro con cámara de video. Para disminuir la fricción entre las bases de las muestras y los platos de compresión se colocó en la interfase una capa fina de una pasta lubricante de BN hexagonal.

2.5. Comportamiento a la corrosión

Se ha medido la resistencia frente a la corrosión en diferentes medios. Se han utilizado electrolitos muy simples, como una disolución al 5% en peso de NaCl, y disoluciones más complejas, como una solución tampón de PBS (*Phosphate Buffer Saline*), y diferentes medios celulares utilizados para el cultivo de células, que poseen además gran cantidad de compuestos orgánicos.

Al sumergir los materiales en disoluciones acuosas, la HAP es estable pero el Mg se corroe formando principalmente gas H_2 y $Mg(OH)_2$, que precipita en la superficie del material siguiendo la Reacción 2.1:



El $Mg(OH)_2$ que precipita en la superficie, forma una capa encima del material que posee carácter pseudo-protector, impidiendo en principio que continúe la corrosión. No obstante, aparecen altos esfuerzos de tracción lateral que dan lugar a grietas y poros en la capa protectora, lo que expone de nuevo parte de la superficie del material al líquido corrosivo, de manera que la corrosión continúa.

2.5.1. Método a pH constante

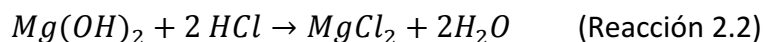
Este método se utilizó para estudiar la resistencia a la corrosión en una disolución de NaCl al 5% en peso. Al producirse la reacción de corrosión, el pH de la disolución aumenta a valores básicos. Mediante la adición de una disolución ácida se contrarresta el aumento de pH, evitando así la precipitación del hidróxido de magnesio. Midiendo la cantidad de disolución ácida necesaria para mantener el pH en el valor deseado, en función del tiempo, se puede obtener la cantidad de Mg disuelto o corroído y con ello obtener el coeficiente de corrosión intrínseco del material (Tiwari y Bommarito 2002).

2.5.1.1. Preparación de las muestras, electrolito y disoluciones

Las muestras se cortaron en cilindros, se pulieron por todas las caras con papel de SiC de P1000 hasta eliminar las grietas superficiales, dejando una superficie de exposición de aproximadamente 400 mm². Se realizaron dos muescas a ambos lados del cilindro para colgar la muestra con un hilo de nylon durante los experimentos.

Como el electrolito utilizado es NaCl se optó por utilizar como disolución ácida de HCl (0.1 M), minimizando así el número de iones diferentes en el electrolito al añadir el ácido. Las disoluciones se prepararon con agua desionizada y NaCl al 99% de pureza (Alfa Aesar). Para el HCl se partió de una disolución concentrada 5.0 N suministrada por “Alfa Aesar”. Para todos los experimentos se utilizaron 500 ml de electrolito, preparado 24 horas antes de empezar los experimentos.

Al añadir este ácido se forma MgCl₂, el cual posee una alta solubilidad en disolución acuosa, lo que impide la formación de Mg(OH)₂. Así, se produce la reacción 2.2:



2.5.1.2. Procedimiento experimental

El dispositivo experimental se muestra en la figura 2.11. Consiste en un vaso de precipitados donde se va a producir la corrosión, sobre el que se coloca una bureta de 10 ml con el ácido. El sistema se mantiene a temperatura constante de 20 °C y en continua agitación. El valor del pH se mide continuamente con un pH-metro de sobremesa modelo “Hanna Instruments-HI 3222”. La muestra se cuelga de un hilo de nylon y se registra la cantidad de HCl necesaria para mantener el pH entre 5 y 7 en función del tiempo. Los experimentos se realizaron durante 8 horas ininterrumpidas.

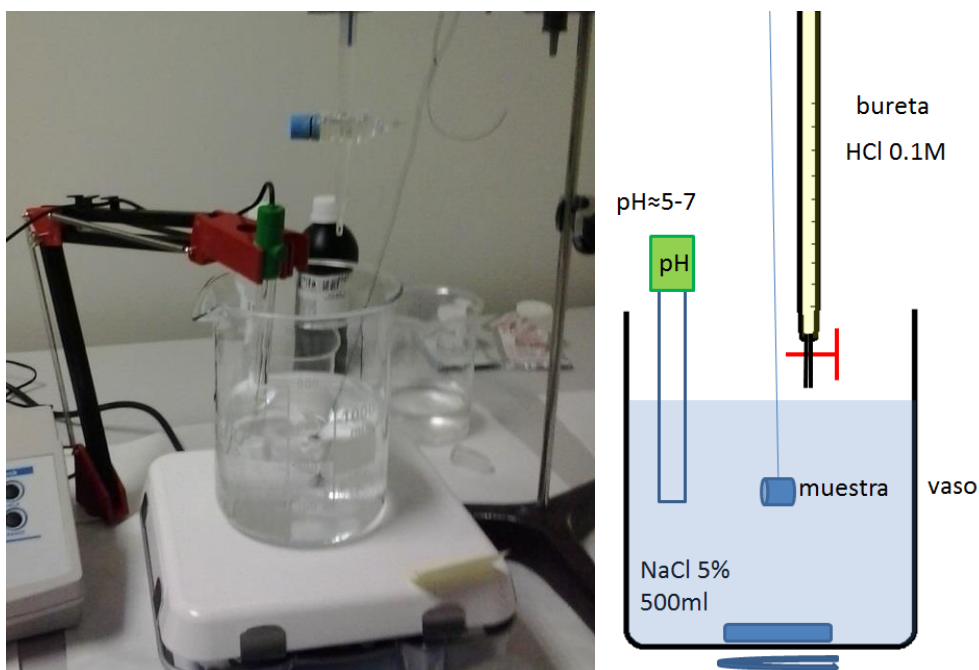


Figura 2.11. Dispositivo experimental y esquema utilizado para el método a pH constante.

2.5.2. Método de formación de Hidrógeno

Este método se utilizó para estudiar la resistencia frente a la corrosión en PBS y medios de cultivo celulares.

Como se ha visto, en la reacción de corrosión de Mg con disoluciones acuosas (reacción 2.1) se produce H_2 como uno de los productos de la corrosión. Con este método se va a medir de forma indirecta la corrosión del material mediante la medida de producción de H_2 en función del tiempo (Shi y Atrens 2011).

2.5.2.1. Preparación de las muestras y de los electrolitos

Las muestras se cortaron en discos y se pulieron por todas las caras hasta eliminar las grietas superficiales. Las muestras se pegaron con un pegamento inerte a la base del vaso donde tendrá lugar la reacción, dejando una superficie de exposición de aproximadamente 160 mm^2 .

La disolución PBS (*Phosphate Buffered Saline*), se preparó mediante la disolución de pastillas de PBS, suministradas por “Sigma”, en agua desionizada hasta obtener una concentración final de fosfatos de 0.01 M, cloruro de potasio 0.0027 M y cloruro de sodio 0.137 M. Esta disolución es muy utilizada como primera aproximación a experimentos que utilizan entornos biológicos debido a la capacidad del tampón fosfato para mantener el pH. Los experimentos con PBS se realizaron en 800 ml de disolución por réplica hasta un tiempo total de 100 horas.

Para acercarnos más a los entornos biológicos se ha realizado este tipo de experimentos con diferentes medios de cultivo celulares. En este caso los ensayos se realizaron en 100 ml de electrolito para cada réplica y un tiempo total de 48 horas.

Los medios de cultivos celulares utilizados son:

- Medio para cultivo de fibroblastos del tipo RPMI 1640 (Lonza), suplementado con 100 UI/ml de penicilina y

100 UI/ml de estreptomicina, 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS-Lonza), 2 mM de glutamina (Difco) y 1 mM de piruvato de sodio (Difco).

- Medio para cultivo de osteoblastos del tipo MEM alpha (Life technologies), suplementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 UI/ml de estreptomicina y 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS-Lonza).
- Medio de cultivo de osteoclastos del tipo MEM alpha (Life technologies), suplementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 UI/ml de estreptomicina y 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS-Lonza) y añadiendo bifosfato de sodio para tener una concentración final de 3.5 mM y 50 µg/ml de L-ácido ascórbico (Sigma).

2.5.2.2. Procedimiento experimental

El dispositivo experimental se puede observar en la figura 2.12. La muestra se pega al fondo del vaso y sobre ésta se coloca un embudo invertido. El tubo del embudo se conecta a una bureta de 50 ml, también invertida. El embudo va a servir para direccionar las burbujas de H₂ hacia la bureta, que va a ser el instrumento de medida del volumen del gas producido. Para simular la temperatura corporal, los experimentos se hicieron a 37 °C, utilizando para ello un baño de agua caliente en circulación. Al encontrarse el experimento a 37 °C, se observó que se producía evaporación del agua del electrolito por lo que se decidió tapar los vasos con parafina y cinta aislante. De esta manera se evita la evaporación de agua y que, por tanto, la concentración de electrolitos aumente con el tiempo. Al producirse la reacción de corrosión, las burbujas de H₂ desplazan el nivel del electrolito en la bureta, lo que permite medir el volumen acumulado de gas producido durante el tiempo.

Se realizaron como mínimo 3 réplicas a la vez y la evolución del pH se estudió simultáneamente en otra muestra.

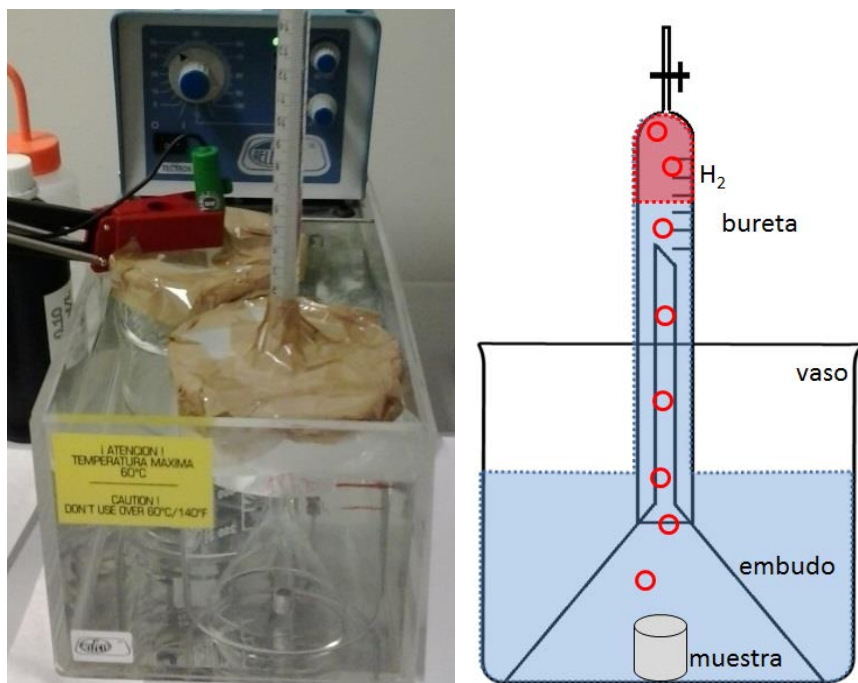


Figura 2.12. Dispositivo experimental del método de evolución de hidrógeno.

2.6. Citotoxicidad

Dado que uno de los objetivos de este estudio es que los materiales puedan utilizarse en el campo de la biomedicina como futuros implantes o prótesis temporales, es necesario llevar a cabo pruebas de biocompatibilidad. Estos experimentos se realizaron según la norma "International Standard ISO-10993, Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro", que recomienda

realizar ensayos de citotoxicidad para los materiales que se degradan con el tiempo. En estos ensayos se sumerge el material a estudiar en medios de cultivo celulares y se evalúa la toxicidad que los productos generados en la corrosión van a inducir a las células.

Todos los ensayos de citotoxicidad se realizaron en el Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge de Lisboa (Portugal) bajo la supervisión de la Dra. Luisa Jordao.

La citotoxicidad se define como una alteración de las funciones celulares básicas, lo que implica un deterioro. Este daño puede ser detectado de diversas formas. Después de hacer diversas pruebas con detectores, el sistema de detección que se ha utilizado para estos experimentos es la reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), que era el que mejor respuesta proporcionaba entre los materiales y los controles. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazán, el cual queda retenido en las células y posee un color morado. Mediante algún método colorimétrico se puede cuantificar, sirviendo así de indicador de la integridad de las mitocondrias cuya actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular (Riss, y otros 2013).

En nuestro experimento, se va a determinar la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a los extractos obtenidos de los materiales S-xHAP y L-xHAP, lo que nos dará información acerca de la toxicidad de éstos.

2.6.1. Preparación de muestras, medios de cultivo y tipos de células

Los ensayos se realizaron con muestras en sección transversal, en forma de discos de 10 mm de diámetro y 1.5 mm de espesor, pulidas a espejo. Fueron esterilizadas en ambas caras mediante exposición a luz

ultravioleta (UV) durante 24 horas. Para preservar la esterilización se envasaron al vacío en bolsas pre-esterilizadas, y así mantenerlas en condiciones óptimas hasta el momento de su uso.

Se evaluó la citotoxicidad inducida en 3 tipos diferentes de células:

- Células MC3T3-E1 Subclone 4 (ATCC-CRL-2593). Son células de ratón de tipo osteoblasto, es decir, células que se encargan de sintetizar la matriz ósea. Estas células se conservaron en un medio con las mejores condiciones para su crecimiento. Este medio consistía en MEM alpha (Gibco-Life Technologies) suplementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 UI/ml de estreptomicina y 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS-Lonza).
- Células L929 derivative of Strain L (ATCC-CCL-1). Son células de ratón de tipo fibroblasto, es decir, células que se encargan de enlazar tejido musculoso. El medio utilizado para el crecimiento de este tipo de células fue RPMI 1640 (Lonza), suplementado con 100 UI/ml de penicilina y 100 UI/ml de estreptomicina, 10% en volumen de suero fetal bovino (FBS-Lonza), 2 mM de glutamina (Difco) y 1 mM de piruvato de sodio (Difco).
- Células de tipo osteoclasto obtenidas por diferenciación de los osteoblastos MC3T3-E1. La diferenciación se produjo siguiendo la norma de la propia marca, la cual consiste en añadir ciertos suplementos al medio (Wang, y otros 1999). Estos suplementos fueron NaH_2PO_4 (compuesto que ya se encontraba en el propio medio) llevado a una concentración final de 3.5 mM de fosfatos totales y L-ácido ascórbico (Sigma) en una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$. Las células se incubaron 10 días en condiciones de 37 °C y 5% CO_2 . Este tipo de células se diferencian de las de tipo osteoblasto en que son células más maduras, forman una red o tejido mucho más entrelazado entre ellas y se encargan de disolver matriz ósea.

2.6.2. Procedimiento

Según la norma utilizada, al ser materiales degradables, se estudian los efectos tóxicos de los productos de la degradación en las propias células. En primer lugar, se ponen en contacto los materiales con los medios de cultivo en la relación de 1.25 cm^2 de superficie de material por cada mililitro de medio de cultivo. El contacto se mantiene durante 24 horas a 37°C y 5% CO_2 . Al mismo tiempo y en las mismas condiciones, se siembran células en platos de 96 pozos de cultivo, con una concentración de 3×10^4 células/ml. La cantidad de disolución en cada pozo es de 200 μl .

Pasadas 24 horas se extraen los materiales, y los extractos con los productos de corrosión se filtran con filtros de membrana de acetato de celulosa de $0.2 \mu\text{m}$ (VWR International). Con más medio mantenido durante 24 horas en las mismas condiciones que los extractos se realizaron disoluciones de los extractos al 100%, 50%, 25% y 12.5% en volumen (porcentaje de extractos). El medio donde se encontraban creciendo las células se sustituyó por estas disoluciones y se mantuvieron en las condiciones de 37°C y 5% CO_2 durante otras 24 horas. Como control, se utilizaron células a las que se les cambió el medio por nuevo medio, al mismo tiempo que se añadieron los extractos a las otras células y se mantuvieron en las mismas condiciones que éstos por 24 horas. A algunos pozos únicamente se les añadió medio nuevo. Estos pozos se utilizaron como blancos para descartar cualquier reacción que pudiera darse entre el medio y el MTT. El nuevo medio fue el mismo que se utilizó para diluir los extractos. Los valores medidos en los controles se interpretaron como 100% de viabilidad, ya que las células se encuentran en las condiciones óptimas.

Después de las 24 horas se extrajeron 100 μl de cada pozo y se añadieron 10 μl de MTT para que reaccionara durante 4 horas. Como ya se ha explicado, este compuesto reacciona con enzimas y da un color morado con diferente intensidad en función de la concentración de células vivas. Transcurridas 4 horas con el MTT, se desechó el sobrenadante y se añadieron 100 μl de dimetilsulfóxido (DMSO) por pozo para disolver el formazán. Se agitaron durante 20 minutos en condiciones de oscuridad y,

posteriormente, se midió la densidad óptica a la longitud de onda de 570 nm.

2.6.3. Tratamiento de datos

Se realizaron al menos 6 réplicas de cada experimento. A partir de los valores de los blancos se calcularon los valores medios para cada uno de los 3 medios. Estos blancos fueron restados directamente de los valores de los correspondientes experimentos y de los controles. De las diferentes réplicas se determinaron los valores medios y, por último se obtuvo un porcentaje de viabilidad metabólica en relación al de las muestras control.

2.6.4. Microscopía Confocal

La microscopía confocal es un tipo de microscopía óptica que permite construir imágenes 3D a partir de las imágenes de diferentes planos. Su mecanismo se basa en el microscopio de fluorescencia, por lo que es necesario que las muestras hayan sido marcadas para emitir fluorescencia.

La muestra es iluminada con un láser o luz coherente en cada punto y se realiza un barrido en las 3 direcciones, permitiendo la recopilación de toda la información para la formación de las imágenes.

Se marcaron los núcleos y citoesqueletos de las células de tipo osteoblasto (MC3T3-E1) en contacto con los extractos sin diluir (100%) de los materiales L-xHAP y S-xHAP, lo que permitió la obtención de imágenes. El microscopio utilizado fue un “Leica SP2”.

2.6.4.1. Preparación de las muestras

En platos de 24 pozos se colocaron discos de vidrio (bioMérieux) que sirvieron de soporte para las células. Estas, con una concentración de

3×10^4 células/ml, se mantuvieron durante 24 horas inmersas en medio de cultivo a 37 °C y 5% CO₂ para, posteriormente, sustituir el medio por extractos al 100%, donde se mantuvieron otras 24 horas.

Posteriormente, para cada pozo, se fijaron las células con 4% p-formaldehído durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS (Sigma) y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ durante 15 min. Antes de permeabilizarlas se incubaron durante 15 min con 50 mM de cloruro de amonio. Para la permeabilización se usó 0.1% de triton X-100 durante 30 min. De nuevo se lavó 3 veces con PBS y se dejó incubando con solución de bloqueo durante 30 min (0.4% gelatina de piel de pescado en PBS). Se incubaron con solución 1:50 de Alexa 568 phalloidin (Molecular Probes / Thermo Fisher Scientific) para marcar los citoesqueletos. Finalmente, se lavó cada pozo 2 veces con PBS, una vez con agua y se montaron los discos con DAPI 5 µg/ml durante 3 min, marcando los núcleos.

2.7. Capacidad de formación de *biofilms*

Un *biofilm* es la formación de una comunidad de microorganismos que han crecido de manera organizada, adherida a una superficie viva o inerte. Esta es la forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. Si se forman en la superficie de un implante pueden provocar infecciones, por lo que es muy interesante el estudio de la capacidad de formación de *biofilms*.

A partir de los resultados obtenidos de citotoxicidad, se eligieron los 3 materiales con menor toxicidad. Con estos materiales se llevó a cabo un estudio sobre la capacidad de formación de *biofilms* de bacterias. Estos materiales fueron S-Mg puro, S-10HAP y L-10HAP. Estos estudios, al igual que el análisis de citotoxicidad, se realizaron bajo la supervisión de la Dra.

Luisa Jordao en el Instituto Nacional de Saude Dr. Ricardo Jorge, en Lisboa (Portugal).

2.7.1. Preparación de las muestras y bacterias

Los materiales se prepararon de la misma manera que la descrita en el apartado 2.6.1 para los ensayos de citotoxicidad.

Se estudió la formación de *biofilms* con dos bacterias de la especie *Staphylococcus aureus*. Este tipo de bacteria posee una alta capacidad de formación de *biofilms* en implantes y es de las más peligrosas en ambientes hospitalarios por producir infecciones postoperatorias (Boucher, y otros 2009). Se utilizó una bacteria de referencia comercial (ATCC-12600-T), la cual se va a nombrar como MRSA-1, y una bacteria aislada clínicamente (MRSA-2). Ambos tipos de bacterias son de las llamadas *Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus* (MRSA), por ser resistentes a antibióticos como la penicilina.

2.7.2. Procedimiento

Las bacterias se prepararon en una concentración de 10^7 CFU/ml en una disolución de 0.9% NaCl, para posteriormente pasar 24 h en disolución Muller-Hinton (MH). De esta disolución se diluyeron en una proporción 1:10 en el medio de cultivo de los osteoclastos sin la adición de antibióticos. Como control se utilizó la superficie del propio fondo de los pozos. Se realizaron al menos 3 réplicas por cada material y tipo de bacteria.

En platos de 24 pozos se colocaron discos de los materiales y se les añadió 1 ml de la disolución con las bacterias. Se encubaron 24 h para permitir la formación de *biofilms* a 37 °C. Del sobrenadante se tomaron alícuotas de 10 µl para estudiar la capacidad antibacteriana, desechando el resto, y los materiales y los fondos de los controles se lavaron vigorosamente con agua destilada. Durante 15 min se dejó reaccionar los

biofilms con 600 μL de cristal violeta para, posteriormente, lavar con agua destilada y diluir en etanol (95%) el cristal violeta que había reaccionado con los *biofilms*. Finalmente se midió la densidad óptica de las disoluciones a 570 nm.

2.7.3. Tratamiento de datos

La capacidad de formación de *biofilms* se obtuvo a partir de las medidas de densidad óptica a 570 nm. Los resultados se normalizaron al área del material o a la superficie de los pozos en el caso de los controles.

Capítulo 3: Caracterización **Microestructural**

Los materiales se han producido mediante ruta pulvimetalúrgica con consolidación por extrusión a 400 °C siguiendo tres procedimientos: a) variar la proporción, x , de partículas de HAP, con $x= 5, 10$ y 15% en peso; b) utilizar polvo de HAP con diferente tamaño de partícula y c) aplicar un tratamiento termo-mecánico posterior por ECAP.

En los siguientes apartados se muestran los resultados de la caracterización microestructural de los polvos iniciales utilizados para la fabricación de los materiales y de los materiales consolidados, prestando especial atención a las características propias de las diferentes familias de materiales.

3.1. Caracterización del polvo

3.1.1. Difracción de rayos-X

El polvo de Mg, suministrado por “Alfa Aesar”, posee una pureza del 99.8%. Una muestra de estos polvos de Mg se caracterizó mediante difracción de rayos-X. En la figura 3.1 se puede observar el difractograma del polvo de Mg en el rango de 2θ entre 25 y 90° comparado con el difractograma calculado (grupo espacial $P6_3/mmc$), así como la diferencia entre ambos. Todos los picos son indexados como fase Mg, aunque en la figura solo se han nombrado los más intensos. Los picos están muy definidos y no se observan fases secundarias.

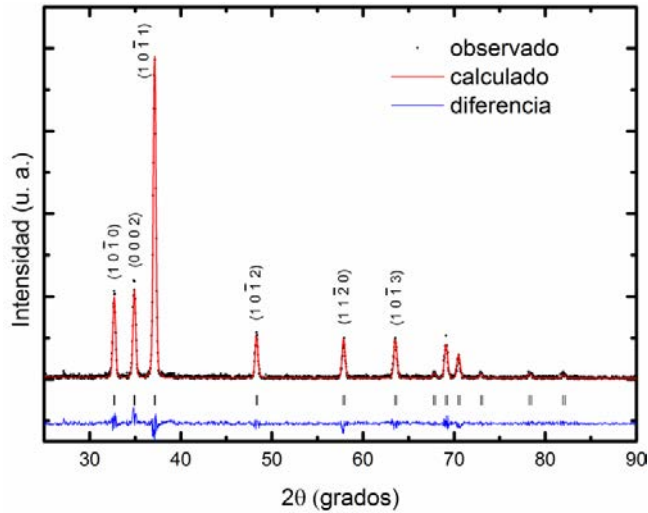


Figura 3.1. Difractograma de rayos-X de polvo de Mg.

El polvo de L-HAP fue suministrado por “Berkeley Advanced Biomaterials” con un tamaño de partícula menor a 150 μm . En la figura 3.2 se puede observar su difractograma junto con el calculado (grupo espacial cristalográfico $P6_3/m$) en el rango de 2θ comprendido entre 15 y 90°. Se muestra también la diferencia entre ambos.

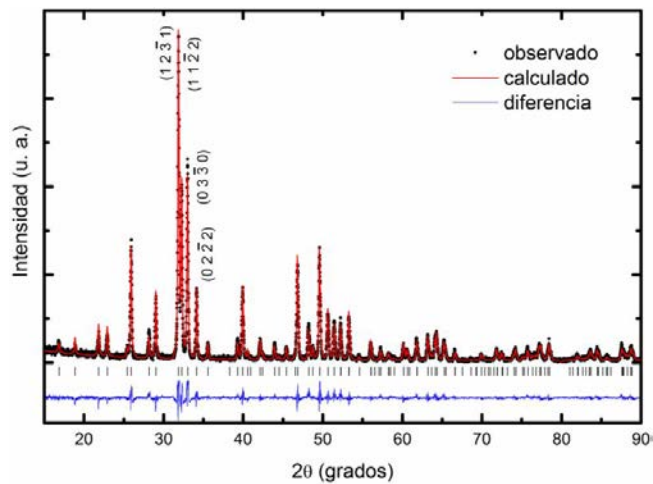


Figura 3.2. Difractograma de rayos-X de polvo de L-HAP.

El polvo de S-HAP fue suministrado por “Plasma Biotol Limited” con un tamaño de partícula menor a 30 μm . En la figura 3.3 se puede observar su difractograma, el calculado y la diferencia entre ambos en el rango de 2θ comprendido entre 15 y 90°.

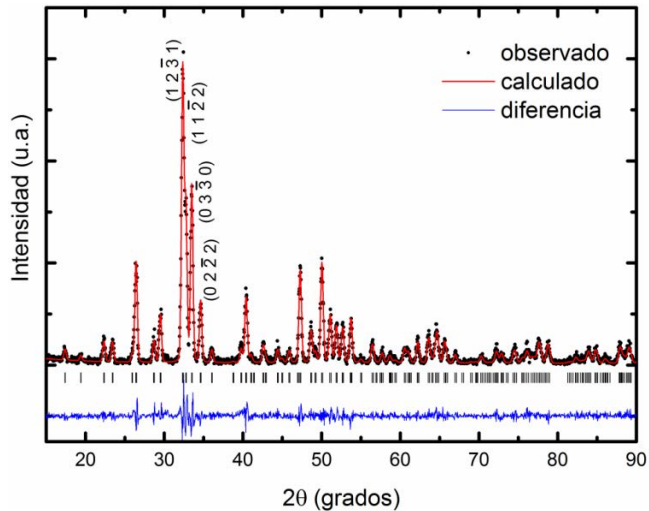


Figura 3.3. Difractograma de rayos-X de polvo de S-HAP.

En los difractogramas de los dos tipos de HAP se observan picos muy definidos e intensos. Todos los picos se indexan a HAP, con grupo espacial cristalográfico $P6_3/m$, aunque en las figuras sólo se han indicado los índices ($h k l i$) de las reflexiones más intensas. No se observan picos de fases secundarias como fosfato tricálcico (β -TCP). Esta fase se puede producir por degradación de la HAP o estar presente como impureza puesto que es uno de los precursores que se pueden usar en la síntesis de HAP. Para el caso de la S-HAP, los picos están más ensanchados que para la L-HAP, lo que indica un menor tamaño de *crystallite*.

Se realizaron difractogramas de los materiales previos a su compactación. Los picos correspondientes a la fase de Mg son de mayor intensidad que los correspondientes a la fase de HAP, incluso para los

materiales con mayor contenido en HAP. Las formas de los picos y su relación de intensidades respecto a otros picos es la misma que las obtenidas para los 3 componentes medidos por separado (Figuras 3.1, 3.2 y 3.3).

3.1.2. *Tamaño de partícula*

Se estudió el tamaño de las partículas de los polvos mediante dispersión de luz láser con el objetivo de conocer el tamaño medio y la distribución de tamaños, ya que la información proporcionada por los suministradores solamente se refería a un tamaño máximo de partícula. En la figura 3.4 se puede observar la distribución de tamaños de: a) Mg, b) L-HAP y c) S-HAP.

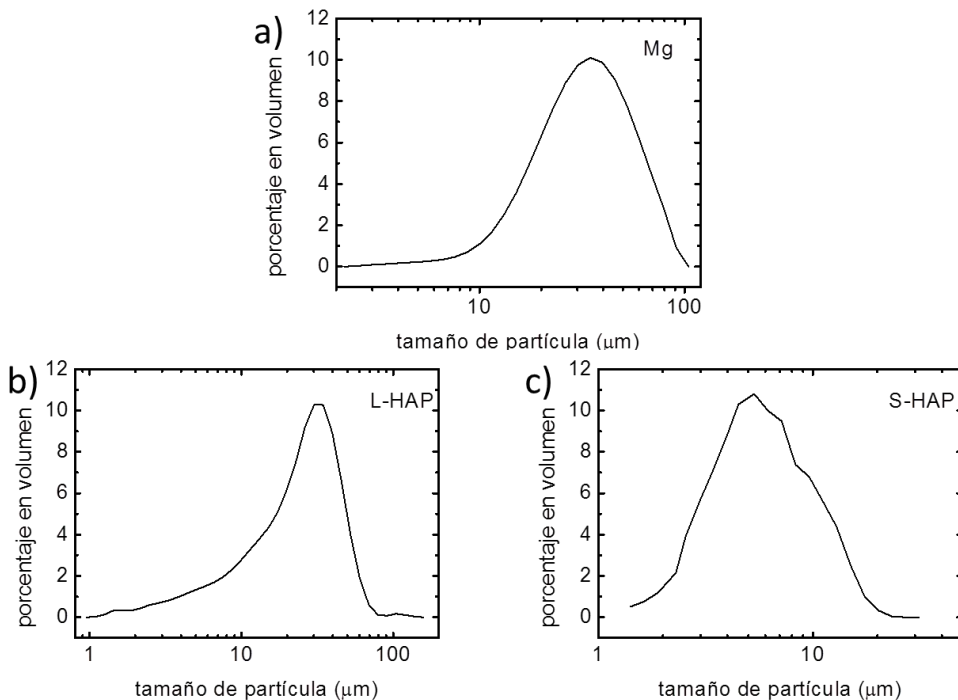


Figura 3.4. Tamaño de partícula de los polvos iniciales: a) Mg, b) L-HAP y c) S-HAP.

Se observa que los polvos con una mayor dispersión de tamaño de partícula son los de L-HAP, con un tamaño comprendido entre 1 μm y 130 μm y moda en volumen de 25 μm . La menor dispersión se encuentra para la S-HAP, con valores entre 1 μm y 25 μm y moda en volumen de 6 μm . Para el Mg, los tamaños se encuentran comprendidos entre 2 μm y 100 μm , siendo la moda de 38 μm .

3.2. Caracterización de los materiales consolidados

3.2.1. Densidad

Las medidas de densidad se muestran en la tabla 3.1. Junto al valor de la densidad experimental se indica el grado de densificación, que se ha calculado a partir de los valores de densidad teóricos calculados mediante la regla de las fases, según se indica en el capítulo 2.3.1. Se puede observar que para los materiales compuestos L-xHAP y S-xHAP la densificación disminuye al aumentar el contenido de HAP y que los materiales S-xHAP poseen valores de densificación más altos que los L-xHAP. Es decir, las partículas de HAP suponen un impedimento durante la extrusión para que fluya el Mg alrededor de éstas dejando mayor porosidad en el material. Además, las partículas mayores de L-HAP impiden este flujo en mayor medida que las pequeñas de S-HAP.

El procesado por ECAP mejora la densificación de los materiales, tal y como indican los valores encontrados para los materiales LE-xHAP. La deformación introducida en el proceso consigue eliminar gran parte de la porosidad de la interfase entre la matriz y las partículas, llegando para todos los materiales de LE-xHAP a unas densificaciones cercanas al 98%.

Material	ρ_{exp} (g/cm ³)	Densificación $\rho_{\text{exp}}/\rho_{\text{teo}}$ (%)
L-Mg	1.630	93.8
L-5HAP	1.714	96.4
L-10HAP	1.746	96.0
L-15HAP	1.749	94.0
LE-5HAP	1.737	97.7
LE-10HAP	1.775	97.6
LE-15HAP	1.825	98.0
S-Mg	1.718	98.8
S-5HAP	1.759	98.9
S-10HAP	1.761	96.9
S-15HAP	1.794	96.4

Tabla 3.1. Densidad y densificación.

3.2.2. Difracción de rayos-X

Las fases presentes en los diferentes materiales se han estudiado por difracción de rayos-X. Estas medidas se han realizado tanto en sección longitudinal como transversal a la dirección de extrusión, identificándose picos correspondientes a las fases: Mg, HAP y MgO (ésta con picos de muy baja intensidad). En la figura 3.5 se muestran los difractogramas obtenidos en sección longitudinal a la dirección de extrusión, en el rango 2θ entre 25 y 60°, de los materiales: a) L-15HAP, b) LE-15HAP y c) S-15HAP. También se muestran ampliadas las zonas donde mejor se observan los picos de HAP y de MgO.

Todos los picos pertenecientes a la fase de Mg se indexaron, encontrándose que la relación de intensidades entre las familias de planos (0 0 0 2) y (1 0 $\bar{1}$ 1) dependía del proceso de producción. En los diagramas

de difracción de rayos-X de la mezcla de polvos se había observado que el pico con mayor intensidad era el pico de la familia $(1\ 0\ \bar{1}\ 1)$ del Mg, lo que coincide con el diagrama teórico que se obtiene cuando los granos y/o subgranos que forman las partículas se encuentran orientados al azar. Tras el proceso de extrusión la intensidad relativa entre los picos cambia, siendo para las muestras L-xHAP y S-xHAP, en sección longitudinal, el pico más intenso el de la familia de planos $(0\ 0\ 0\ 2)$ del Mg, lo que significa un mayor número de granos orientados en esa dirección, y lo que se traduce en una orientación preferente en el material, o material texturado. Al realizar el procesado ECAP, la intensidad del pico $(0\ 0\ 0\ 2)$ disminuye y se iguala a la intensidad de $(1\ 0\ \bar{1}\ 1)$, lo que significa que gran parte de esos granos que se habían orientado durante el proceso de extrusión cambian su dirección con el procesado mediante ECAP (Lin, Huang y Langdon 2005).

En cuanto a la fase de HAP únicamente se observan los picos que eran más intensos en el diagrama de difracción correspondiente al polvo. Su intensidad aumenta con la concentración de HAP pero su valor es muy pequeño comparado con la intensidad de los picos pertenecientes al Mg. También en los materiales consolidados los picos correspondientes a la S-HAP aparecen más ensanchados e intensos.

En cuanto a la fase de MgO, sólo se identifica un pico ancho y poco intenso que coincide con la familia de planos $(2\ 0\ 0)$. La intensidad es menor para la familia de materiales S-xHAP que para la familia L-xHAP, lo que indica una posible formación de partículas de MgO durante el proceso de extrusión asociado a la obtención de los materiales L-xHAP.

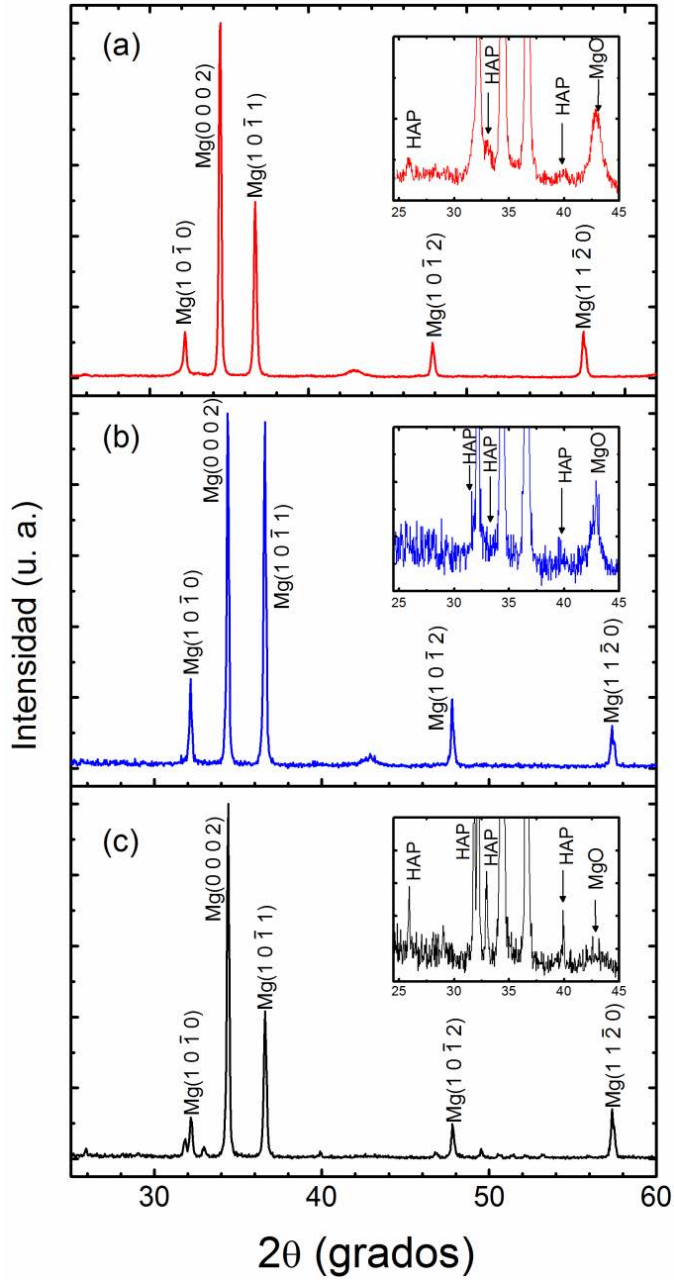


Figura 3.5. Difractogramas de Rayos-X de los materiales: a) L-15HAP, b) LE-15HAP y c) S-15HAP.

3.2.3. Microscopía Óptica

La microestructura de los materiales consolidados se caracterizó mediante microscopía óptica. Para revelar las fronteras de grano se realizó un ataque con ácido pícrico según se recomienda en (Society 2004). En todos los materiales se observan granos de Mg alargados en la dirección de extrusión rodeando las partículas de HAP, de contraste oscuro en las micrografías (Figura 3.6). Este hecho indica que en la extrusión, el Mg se comporta casi como un fluido alrededor de las partículas de HAP. Este comportamiento permite acomodar los granos de Mg alrededor de las partículas de HAP pero, al no ser totalmente un fluido ya que el Mg no llega a fundirse, puede haber zonas donde la conexión entre los dos componentes no sea perfecta, formándose poros en la interfase. Esta deformación plástica del Mg durante el procesado se distingue mejor en los materiales L-xHAP.

La figura 3.7 muestra imágenes de microscopía óptica correspondientes a planos longitudinales a la dirección de extrusión de la familia de materiales L-xHAP. Para todas las composiciones los granos de Mg presentan formas muy alargadas. El tamaño y forma irregular de las partículas de L-HAP dificulta el flujo del magnesio, produciéndose la deformación de los granos alrededor de las partículas.

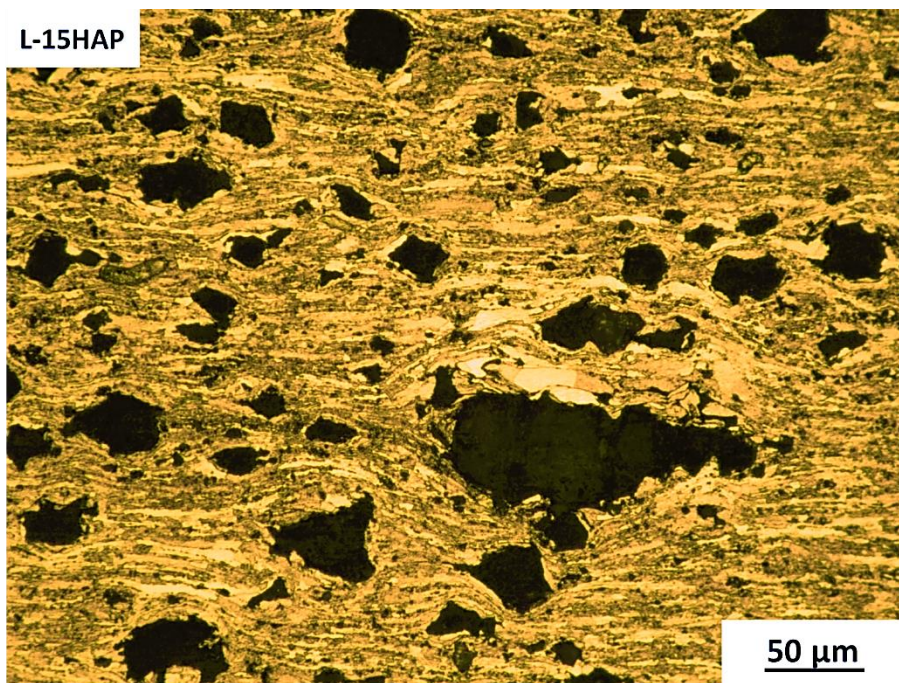


Figura 3.6. Imagen de microscopia óptica de la muestra L-15HAP en sección longitudinal a la de extrusión.

La figura 3.8 muestra imágenes correspondientes a planos longitudinales a la dirección de extrusión de los materiales S-xHAP. Como en el caso anterior, los granos de Mg son alargados, sin embargo, las partículas de S-HAP son muy pequeñas y con formas regulares, lo que ayuda a mejorar la cohesión entre los componentes durante la extrusión y por tanto la densificación.

En las imágenes de los materiales de Mg puro, L-Mg y S-Mg, se han observado partículas que mediante EDX se han identificado como MgO, fase que ya se detectó mediante difracción de rayos X en los materiales consolidados (capítulo 3.2.2). Alrededor de las partículas de MgO se

observa el flujo de Mg, lo que indica que las partículas de MgO se encuentran dentro del material. Durante el proceso de fabricación las etapas de mezcla y compactación en frío se realizan en atmósfera inerte. Posteriormente, parte de la superficie de los compactos previos a ser extruidos se oxida superficialmente al encontrarse en contacto con el aire y a una temperatura de 400 °C. Durante la extrusión, esas capas superficiales de MgO se rompen, introduciéndose en el material y produciendo las partículas de MgO embebidas en la matriz (Tan, y otros 2016).

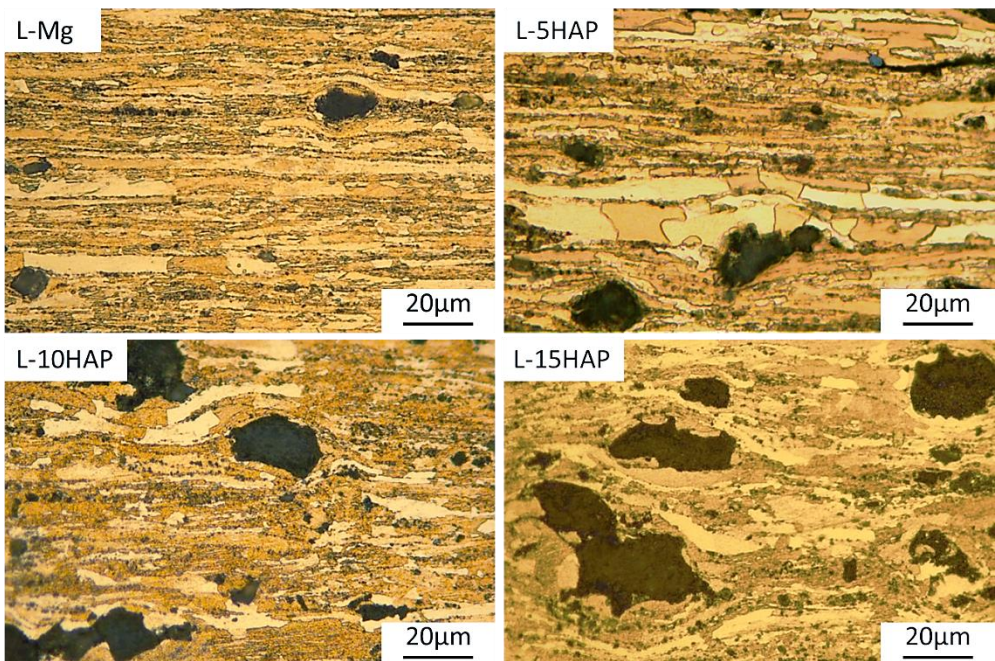


Figura 3.7. Imágenes de microscopía óptica de la familia L-xHAP en sección longitudinal a la dirección de extrusión.

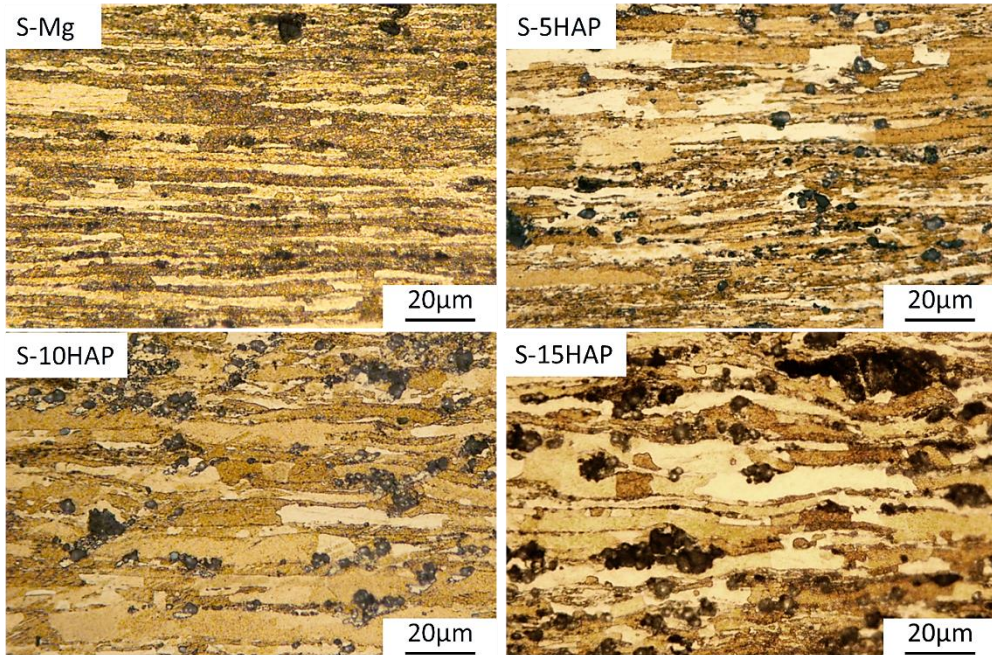


Figura 3.8. Imágenes de microscopía óptica de la familia S-xHAP en sección longitudinal a la dirección de extrusión.

En ambos materiales extruidos, L-xHAP y S-xHAP, los granos de Mg poseen una gran dispersión de tamaños de grano aunque se puede ver que al introducir HAP los granos tienden a ser más equiaxiales. Para los materiales de Mg puro se han medido granos con longitudes entre 20 y 50 μm y anchuras que varían desde tamaño sub-micrométrico hasta 8 μm . Debido a esta dispersión de valores se calculó la relación longitud/anchura media de los granos, encontrándose para los materiales de Mg puro un valor de ~ 14 . Este valor se redujo a ~ 6 al incorporar partículas de HAP.

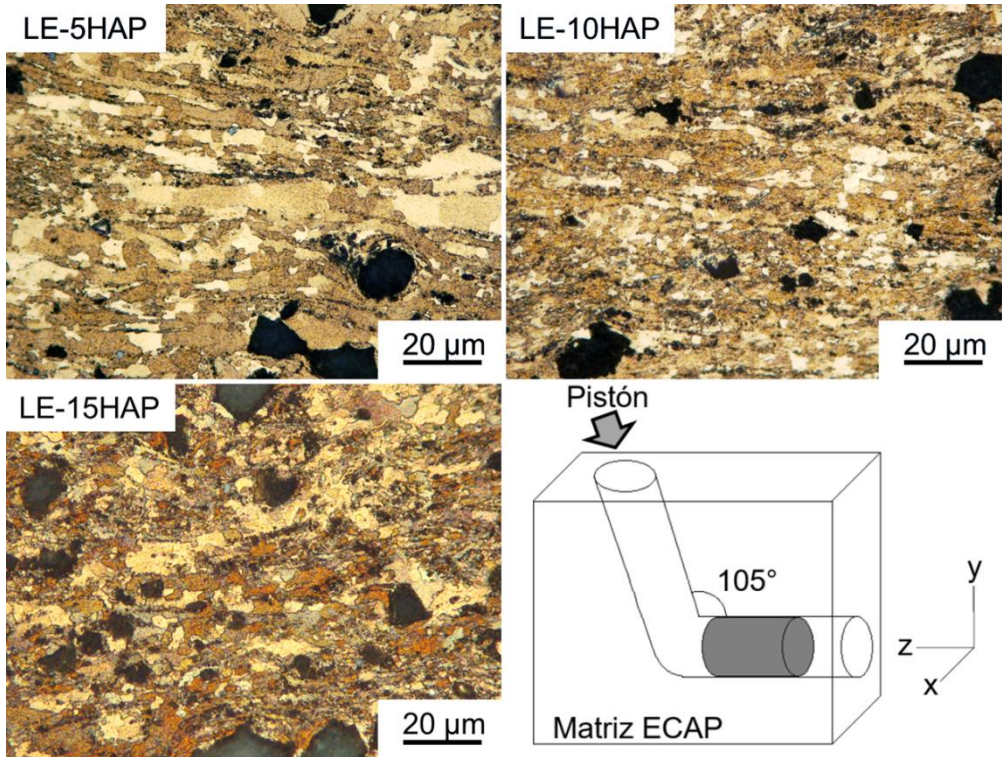


Figura 3.9. Imágenes de microscopía óptica de la familia LE-xHAP en sección longitudinal (plano X-Z) al canal de salida del ECAP.

En los materiales post-procesados mediante ECAP, LE-xHAP, también se observan granos alargados en dirección paralela al canal de salida del ECAP (plano X-Z), pero son de longitud menor y más equiaxiales que los observados en los L-xHAP, antes del procesado ECAP (Figura 3.9). La longitud de los granos de Mg disminuye por debajo de 10 μm y aumenta su anchura, reduciéndose el valor medio de la relación longitud/anchura a ~2, lo que implica una fuerte disminución con respecto al material sin ECAPear. No se observa tanta dispersión en el tamaño de los granos como en el material sin ECAPear. El aumento de la anchura del grano está relacionado con la recrystalización dinámica producida durante el proceso, puesto que se lleva a cabo a 300 °C. Respecto a las partículas de HAP, se observa la fragmentación en otras más pequeñas; también se aprecian partículas en

las se ha iniciado la ruptura pero no se ha completado, al no ser suficiente el número de pasadas de ECAP (Figura 3.10). Estos resultados indican que el proceso de ECAP, además de disminuir el tamaño de grano de la matriz de Mg, da lugar a una distribución más homogénea de las partículas de HAP.

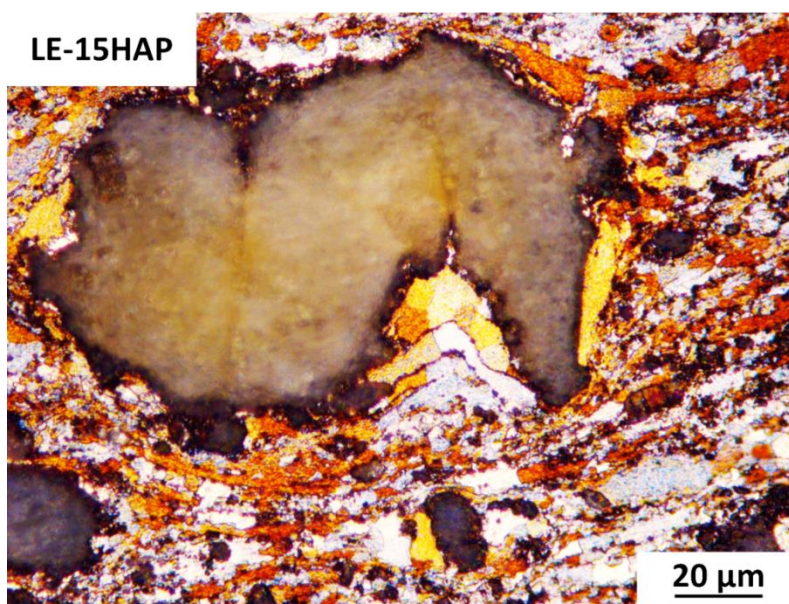


Figura 3.10. Imagen de microscopía óptica de una gran partícula de HAP en una muestra de LE-15HAP en la que se aprecia el comienzo de fragmentación debido al ECAP.

3.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Para caracterizar composicionalmente los materiales se observaron mediante microscopía electrónica de barrido. En la figura 3.11 se pueden observar imágenes de SEM de las familias L-xHAP y S-xHAP tomadas con electrones retrodispersados. La fase gris oscura se corresponde con la matriz de Mg, mientras que las partículas de HAP aparecen con un contraste gris claro. La distribución de las partículas de HAP es muy homogénea en todos los composites.

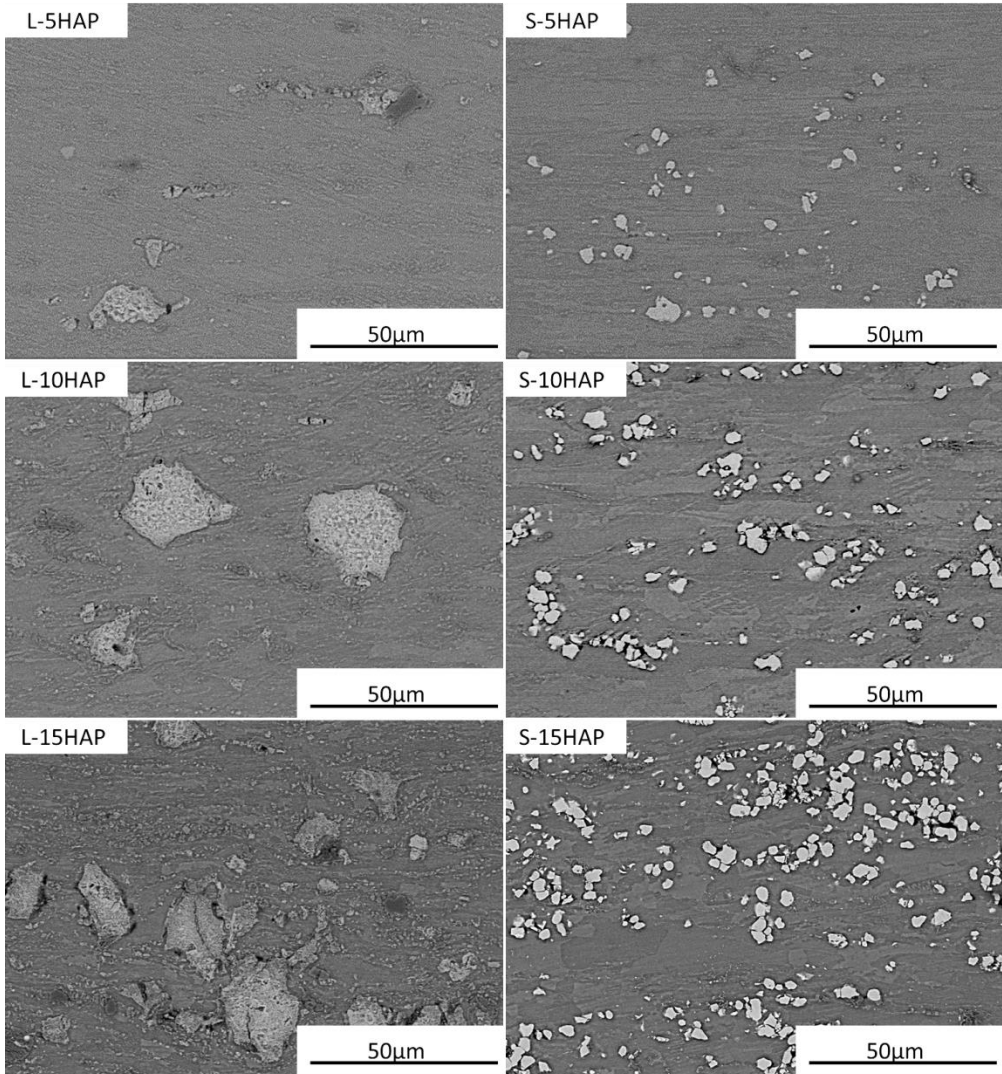


Figura 3.11. Imágenes de SEM de los materiales compuestos L-xHAP y S-xHAP (electrones retrodispersados).

Se observaron además unas partículas con un contraste más oscuro cuyo análisis mediante EDX determinó que correspondían a partículas de MgO. Su tamaño es inferior a la micra en el caso de la familia S-xHAP y de $\sim 10 \mu\text{m}$ para la L-xHAP. El número de estas partículas es mayor en la familia

L-xHAP que en la S-xHAP y su cantidad aumenta al aumentar el porcentaje de HAP. Esto puede ser debido a las características propias de las partículas de L-HAP. Según los datos de composición, suministrados por el proveedor, la L-HAP posee una relación Ca/P de 1.64, lo que se asocia a vacantes de calcio. Esto, junto con la morfología irregular y esponjosa de las partículas, hacen que las partículas de L-HAP puedan almacenar vapor de agua en su estructura, que puede liberarse a una temperatura por encima de 250 °C (Parente, y otros 2013). Como esta temperatura se supera durante la extrusión, el oxígeno contenido en el vapor de agua puede dar lugar a la formación de partículas de MgO en el interior, cuya concentración aumenta con el porcentaje de L-HAP.

Las imágenes de la figura 3.12 corresponden a los composites fabricados con un 10% de contenido en HAP. En ellas se muestran las diferencias morfológicas entre las partículas de HAP formadas a partir de cada uno de los dos tipos de polvo de HAP utilizados. Además de la diferencia en su tamaño, se observan diferencias morfológicas: estructuras regulares y compactas en la familia S-HAP (Figura 3.12a) y estructuras irregulares y esponjosas en las L-HAP (Figura 3.12b). Esta estructura esponjosa de las L-HAP y esa cantidad de cavidades, como se ha comentado, pueden dar lugar a acumulación de gases en su interior.

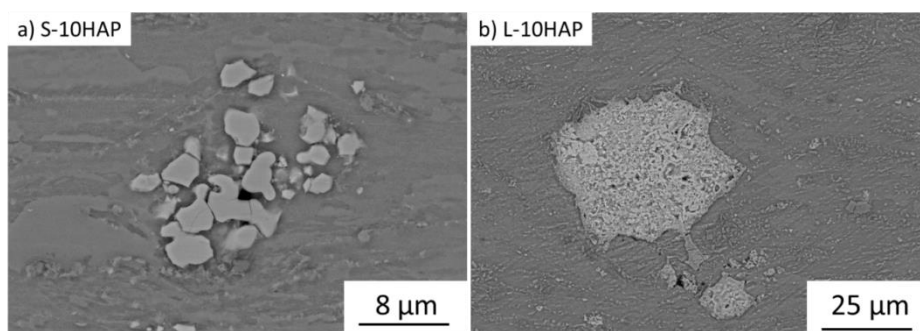


Figura 3.12. Imagen de SEM mostrando las diferencias morfológicas de los dos tipos de HAP utilizadas, a) S-HAP y b) L-HAP.

Los materiales LE-xHAP, Figura 3.13, presentan una composición similar a la encontrada para los materiales L-xHAP. En color gris oscuro se observa la matriz de Mg y en gris claro las partículas de HAP. También se observan partículas de MgO en un contraste más oscuro que la matriz y su aumento con el aumento en el contenido de HAP.

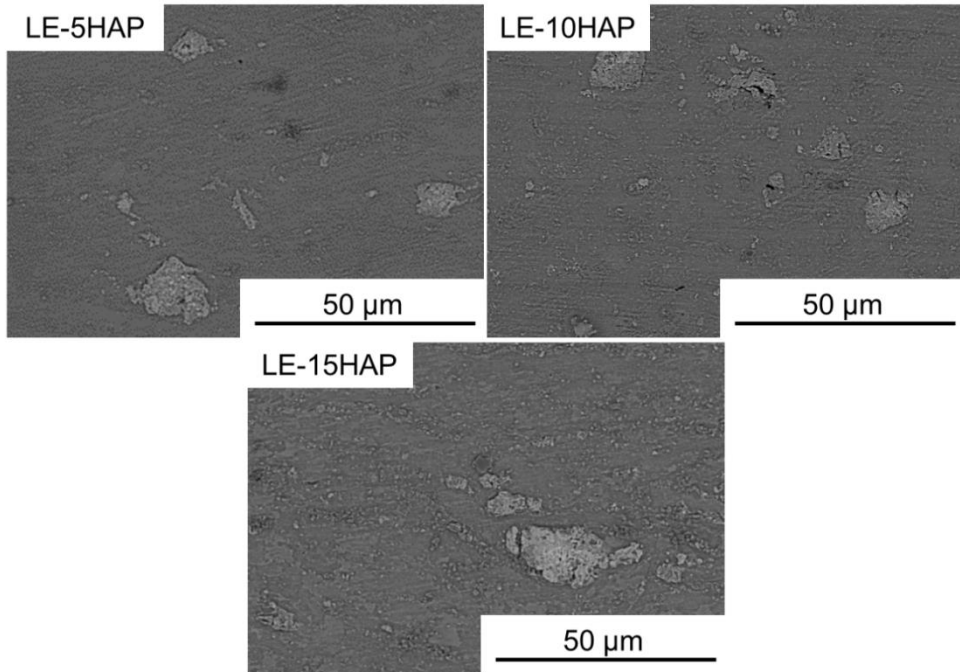


Figura 3.13. Imágenes de SEM de los materiales compuestos LE-xHAP (electrones retrodispersados).

Con el objetivo de observar la estructura de grano se atacaron las muestras con un reactivo a base de nítrico y clorhídrico, que proporciona buen contraste para revelar las fronteras de grano de aleaciones de Mg en microscopía electrónica (Chou, y otros 2005). Desafortunadamente, la alta acidez de este reactivo disuelve gran parte de las partículas de HAP dejando en los materiales una superficie muy deteriorada.

En la figura 3.14 se muestran micrografías de la sección longitudinal del material con 10% de HAP para todas las familias. En su obtención se combinaron diferentes configuraciones de los detectores para obtener un mejor contraste y visualizar los granos de la matriz de magnesio.

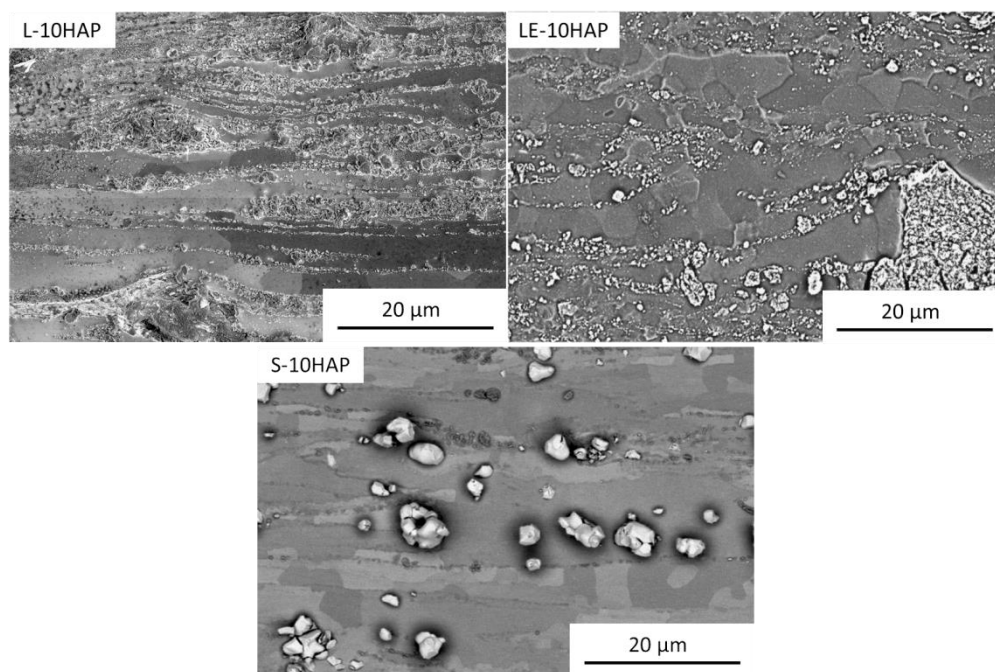


Figura 3.14. Imágenes de SEM de los materiales L-10HAP, LE-10HAP y S-10HAP en sección longitudinal a la dirección de extrusión y canal de salida del ECAP (plano X-Z).

Otro hecho importante observado en las imágenes de SEM, es la porosidad asociada a la interfase Mg-HAP. En la figura 3.15 se pueden apreciar partículas de L-HAP con mucha porosidad alrededor. Estas partículas de L-HAP, como ya se había mencionado, poseen gran irregularidad en su superficie, por lo que al fluir el Mg alrededor de ellas puede dejar huecos. Por ello, en los materiales L-xHAP, el número de poros aumenta con el contenido en HAP, disminuyendo la densificación del

material, tal y como reflejan las medidas de la densidad. En el caso de los materiales S-xHAP, las partículas poseen formas más regulares que permiten un mejor flujo de Mg, mejorando la cohesión entre los granos de Mg y las partículas de HAP. No obstante, aunque en menor grado que en el caso de la familia L-xHAP, sigue disminuyendo la densificación con el porcentaje de partículas HAP. En el caso de los materiales LE-xHAP no se observa esta porosidad en la interfase, lo que confirma los valores de densificación obtenidos con las medidas de densidad en el capítulo 3.2.1.

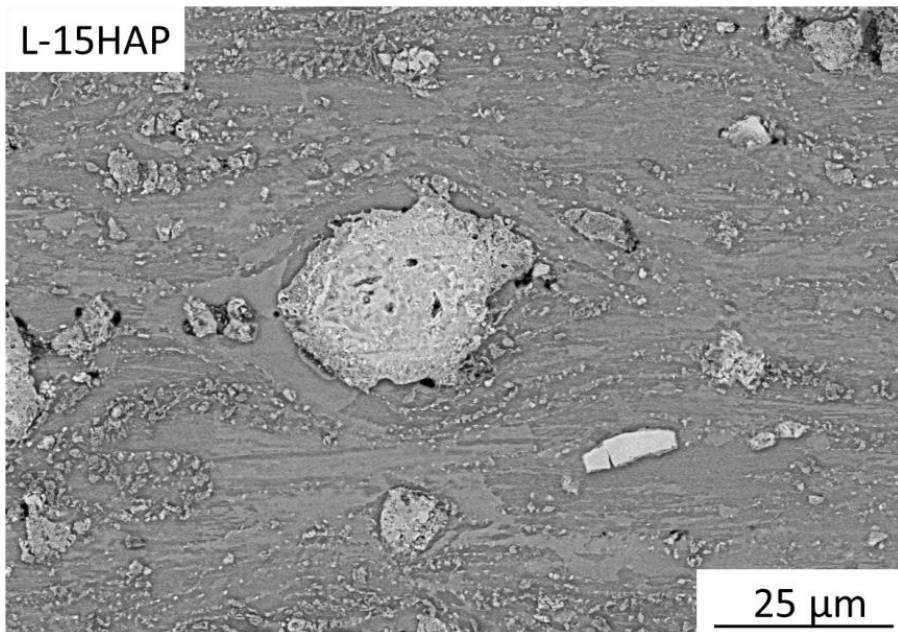


Figura 3.15. Imagen de SEM de una muestra de L-15HAP en sección longitudinal a la dirección de extrusión.

3.2.5. Macrotextura

Las medidas de macrotextura se realizaron sobre muestras cortadas en discos perpendiculares a la dirección de extrusión y, en el caso de los

materiales procesados por ECAP, al canal de salida. Los resultados se representan mediante figuras de polos para los planos prismáticos ($1\ 0\ \bar{1}\ 0$), los planos basales ($0\ 0\ 0\ 2$) y los planos ($1\ 1\ \bar{2}\ 0$) y el índice de textura J (tablas 3.2 y 3.3). Se ha utilizado la misma escala para las diferentes familias de planos y así poder comparar sus intensidades. Tanto para la familia L-xHAP como S-xHAP en la figura de polos de los planos ($1\ 0\ \bar{1}\ 0$), la mayor intensidad aparece en el centro de la figura, indicando que se encuentran orientados en la dirección perpendicular a la dirección de extrusión. Para los planos basales ($0\ 0\ 0\ 2$) la posición de las zonas de mayor intensidad indica que se encuentran orientados a lo largo de la dirección de extrusión. Esta orientación cristalográfica, con planos prismáticos perpendiculares a la dirección de extrusión y basales paralelos a la de extrusión, es típica de metales con celda hexagonal compacta producidos mediante extrusión (Sarker y Chen 2013) y recibe el nombre de textura en fibra. Se observa que a medida que se incorporan partículas de HAP se produce una disminución del índice de textura, lo que indica una disminución de la densidad de planos que se encuentran orientados. Durante el proceso de extrusión del Mg puro, el sistema de deslizamiento principal es de tipo no basal, facilitando el movimiento de los granos de Mg para acoplarse a la textura en fibra; la presencia de partículas de HAP incrementa el deslizamiento de los planos basales (Mackenzie y Pekguleryuz 2008). El análisis de las figuras de polos para la familia ($1\ 1\ \bar{2}\ 0$) revela que estos planos se encuentran formando $\sim 30^\circ$ con los planos prismáticos, lo cual es coherente, ya que éste es el ángulo que forman ambas familias de planos en una estructura hexagonal.

El índice de textura de los materiales LE-xHAP (tabla 3.4) disminuye drásticamente en comparación con el correspondiente índice de la familia L-xHAP. El proceso de ECAP, y en concreto la ruta utilizada B_C, destruye la textura original dejando una orientación de los granos más aleatoria. Esta ruta es la que más elimina la textura de un material (Furukawa, y otros 1998). No obstante, se observa un relativo intercambio de posiciones entre las familias de planos ($1\ 0\ \bar{1}\ 0$) y ($1\ 1\ \bar{2}\ 0$); es decir, con el proceso ECAP hay una cantidad significativa de granos que rotan 30° a lo largo del eje c de la celda hexagonal.

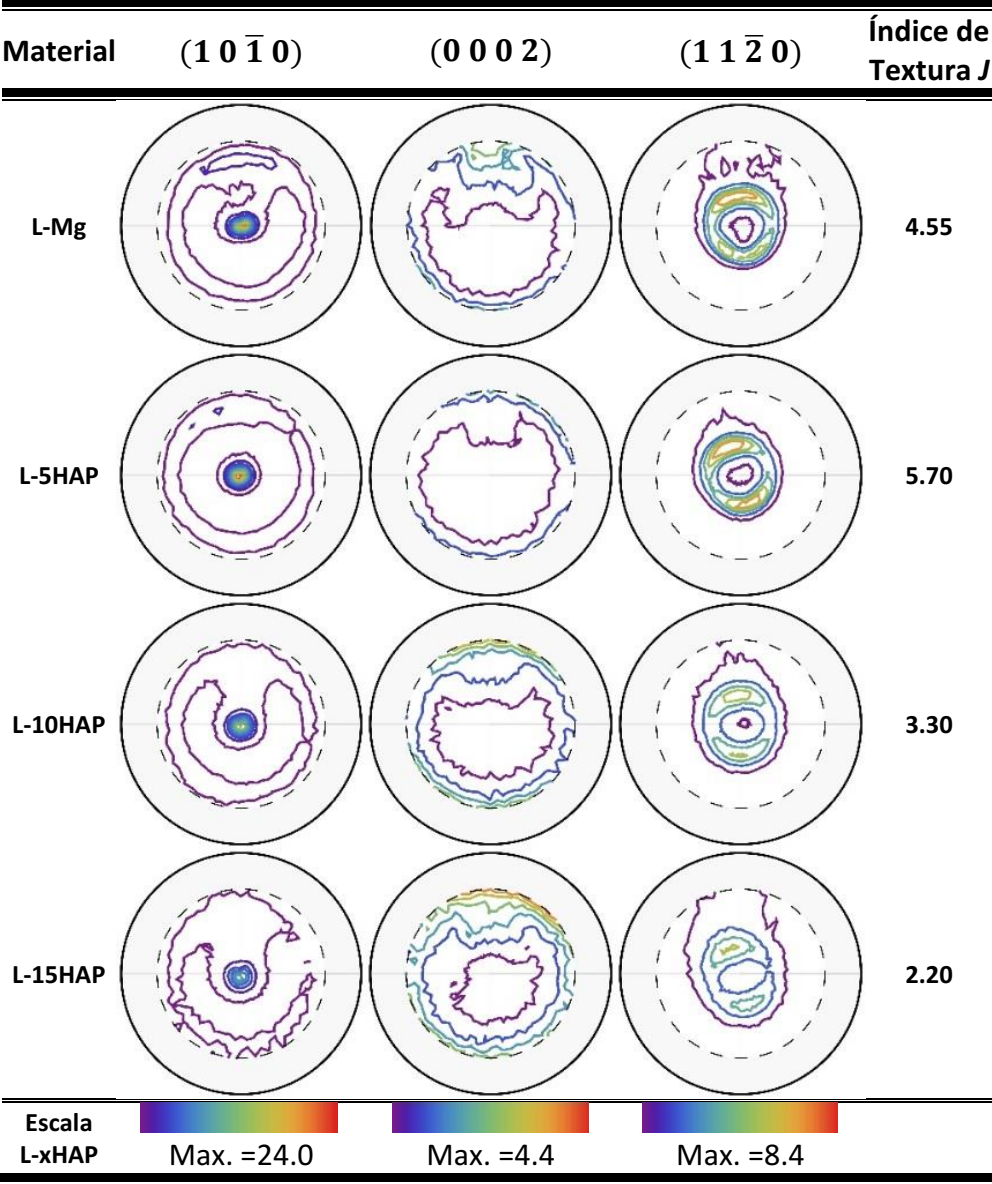


Tabla 3.2. Figuras de polos e índices de textura de la familia L-xHAP.

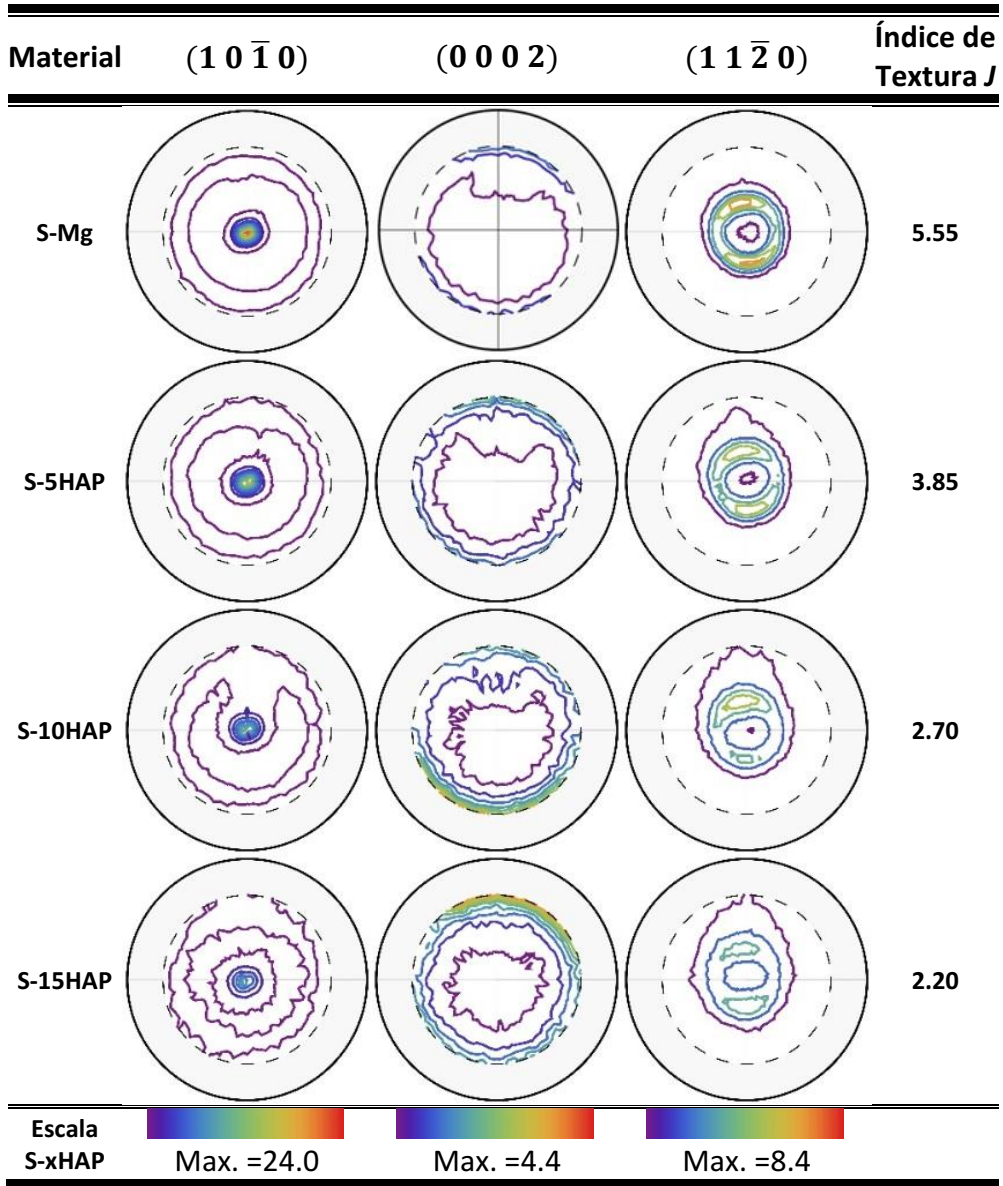


Tabla 3.3. Figuras de polos e índices de textura de la familia S-xHAP.

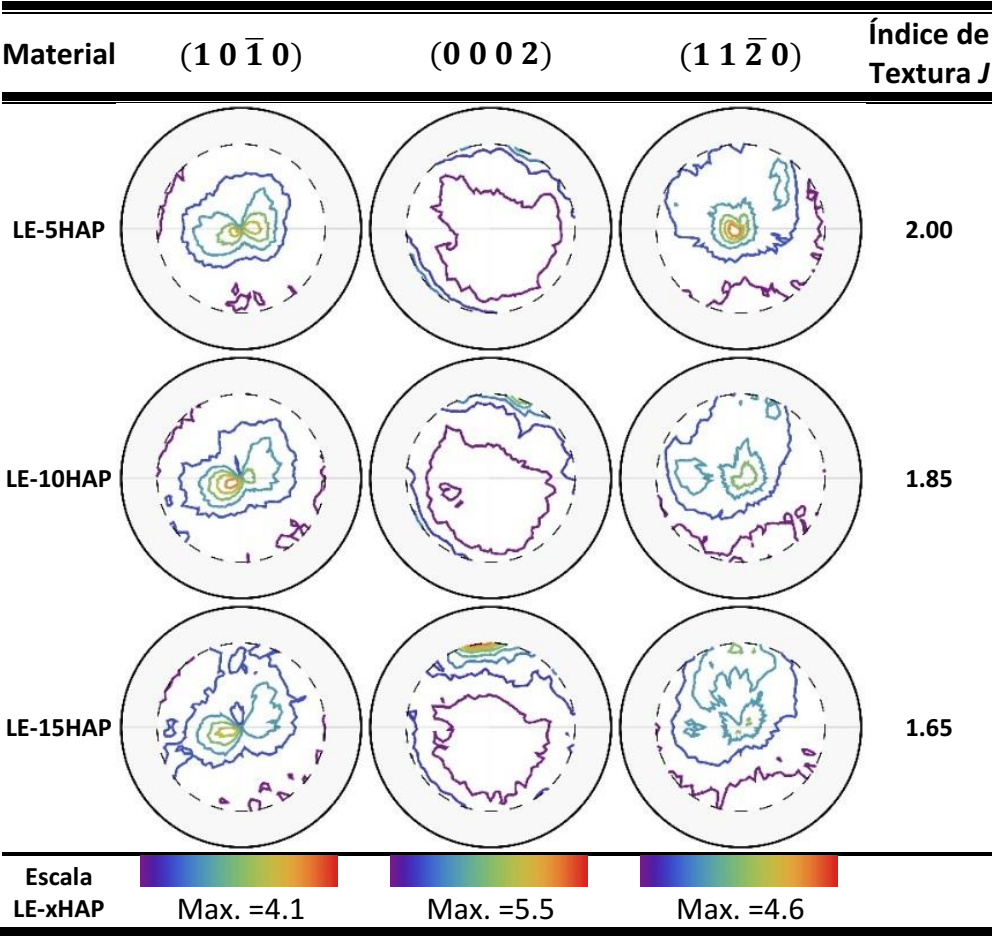


Tabla 3.4. Figuras de polos e índices de textura de la familia LE-xHAP.

Capítulo 4: Propiedades Mecánicas

4.1. Microdureza

Los valores de microdureza de los diferentes materiales (H_V) se obtuvieron a partir de ensayos Vickers. En la tabla 4.1 se pueden ver los resultados obtenidos para los materiales extruidos, L-xHAP y S-xHAP. El porcentaje de HAP se muestra también en tanto por ciento en volumen. Al aumentar el contenido en HAP la microdureza aumenta, siendo mayor en la sección transversal que en la longitudinal. En la tabla 4.1 también se ha incluido el porcentaje de aumento de dureza con el contenido de HAP, respecto al Mg puro de la misma familia.

HAP		L-xHAP				S-xHAP			
%peso	%vol	Transversal		Longitudinal		Transversal		Longitudinal	
		H_V (MPa)	ΔH_V (%)	H_V (MPa)	ΔH_V (%)	H_V (MPa)	ΔH_V (%)	H_V (MPa)	ΔH_V (%)
0	0	519±5	-	490±10	-	523±5	-	500±7	-
5	2.9	560±10	8±3	530±10	8±4	543±7	4±2	520±5	4±2
10	5.9	593±7	14±2	580±10	18±4	559±7	7±2	540±7	8±3
15	9	623±9	20±3	610±10	24±4	585±8	12±2	570±10	14±3

Tabla 4.1. Dureza y aumento de dureza en porcentaje respecto a Mg puro en función del contenido de HAP.

El hecho de que los valores de microdureza sean mayores en la dirección transversal que en la longitudinal está relacionado con el tamaño de grano. La dureza de un material es la resistencia que presenta para ser deformado plásticamente. Según la ley de Hall-Petch (Hall 1951), la dureza de un material es inversamente proporcional al tamaño de grano. Las fronteras de grano actúan como barreras para el movimiento de las dislocaciones, limitando la deformación plástica del material. Cuanto menor sea el tamaño de grano, mayor es el número de fronteras de grano, y más difícil es el desplazamiento de las dislocaciones. En estos materiales, los granos están alargados en la dirección longitudinal, paralela a la dirección de extrusión, por lo que el tamaño de grano es más pequeño en la sección

transversal que en la longitudinal. Esto implica que haya un menor número de fronteras de grano en la sección longitudinal. Por tanto, es esperable una mayor resistencia a la deformación en la dirección transversal.

En la figura 4.1 se representa la variación de la microdureza con el contenido en volumen de partículas de HAP. Comparando los valores de microdureza de las secciones longitudinal y transversal para una misma familia (L-xHAP o S-xHAP), puede apreciarse que ambas curvas tienden a converger al aumentar el contenido de HAP. En cambio, si se comparan las curvas de L-xHAP y S-xHAP para una misma sección, al aumentar el contenido de HAP las curvas tienden a separarse cada vez más. Los análisis de la microestructura de ambas familias de materiales, en el capítulo 3.2.3, han mostrado que, al introducir partículas de HAP, la relación de longitud/anchura de los granos de Mg tiende a disminuir, lo que puede explicar que los valores de microdureza en ambas secciones tiendan a igualarse.

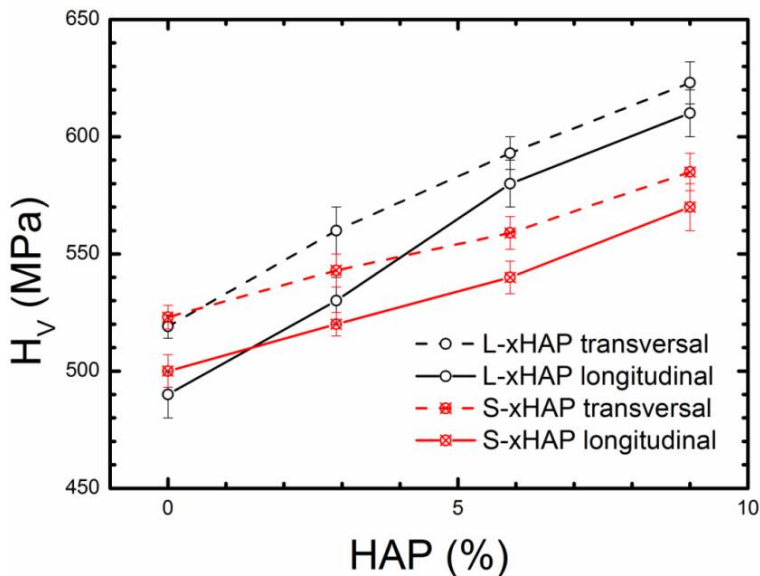


Figura 4.1. Representación de la microdureza frente al contenido en HAP para los materiales extruidos.

Por otro lado, como también se comentó en el capítulo 3.2.4, según los datos de composición suministrados por los proveedores, la L-HAP posee una relación Ca/P de 1.64 mientras que la S-HAP posee una relación Ca/P de 1.67, lo que significa que la L-HAP no es estequiométrica y posee vacantes de Ca. Además su morfología es irregular, con cavidades que permiten almacenar agua en su estructura (Parente, y otros 2013) que puede dar lugar a la formación de partículas de MgO durante el proceso de fabricación. La presencia de estas partículas de MgO explicaría que la microdureza aumentara más en la familia L-xHAP que en la S-xHAP al aumentar el contenido de HAP.

En la tabla 4.2 y en la figura 4.2 se presentan los valores de la microdureza Vickers de los materiales LE-xHAP en comparación con los valores previos al procesado por ECAP. Se observa un aumento de la dureza en ambos planos, transversal y longitudinal con respecto al material extruido. Uno de los efectos del proceso de ECAP es la reducción de la longitud de los granos de Mg. Esto da lugar a un aumento de la densidad de fronteras de grano y por consiguiente al aumento de la dureza del material. En el material sometido a ECAP los valores de microdureza en ambas secciones son muy similares, lo que indica que el proceso ECAP origina una homogeneización de la microestructura.

Material	Transversal		Longitudinal	
	H _V (MPa)	ΔH _V (%)	H _V (MPa)	ΔH _V (%)
L-5HAP	560±10	-	530±10	-
LE-5HAP	586±3	5±2	590±10	11±4
L-10HAP	593±7	-	580±10	-
LE-10HAP	640± 20	8±5	621±7	7±3
L-15HAP	623±9	-	610±10	-
LE-15HAP	690±20	11±5	680±20	11±5

Tabla 4.2. Dureza y endurecimiento en función del proceso de ECAP.

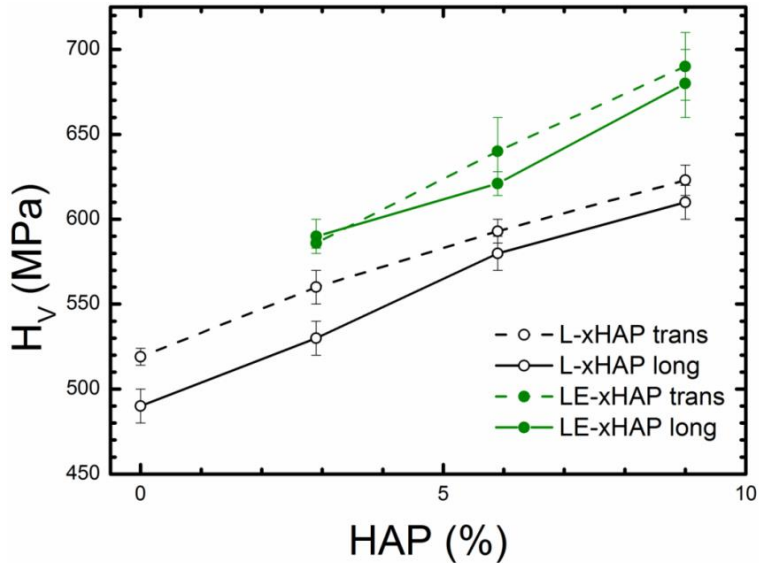


Figura 4.2. Representación de la microdureza frente al contenido en L-HAP para los materiales extrudidos y ECAPeados.

Adicionalmente se estudió la relación entre la microdureza y el índice de textura del material. Estudios anteriores han utilizado el índice de textura de un material para predecir algunas de sus propiedades (Sturcken y Croach 1963). En la figura 4.3 se observa una relación lineal entre la microdureza y la inversa del índice de textura. No se ha representado el material L-Mg debido a las diferentes condiciones usadas en su procesado.

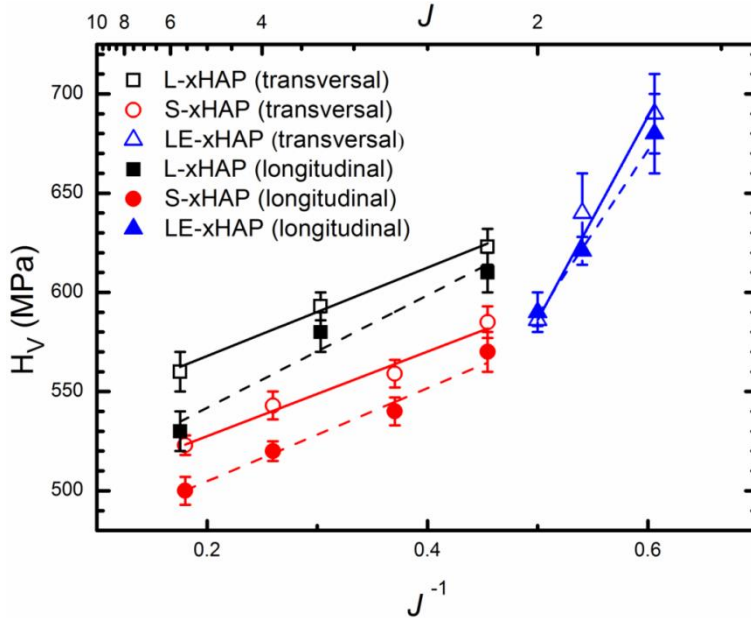


Figura 4.3. Relación del efecto de la textura con la microdureza de los materiales.

La figura revela anisotropía en la microdureza respecto a la sección analizada cuando el índice de textura es mayor que 2, lo que corresponde a los materiales sin ECAPear. Sin embargo, también se observa que el ritmo de aumento de la microdureza con la inversa del índice de textura es prácticamente independiente de la sección analizada. Así, para la sección transversal y longitudinal de los materiales S-xHAP se obtienen los valores 213 ± 19 y 235 ± 24 MPa, respectivamente, y 223 ± 21 y 280 ± 60 MPa para los materiales L-xHAP. El ritmo de aumento para los materiales LE-xHAP es mayor, encontrándose los valores de 1020 ± 120 MPa para la sección transversal y 830 ± 60 MPa para la longitudinal.

4.2. Ensayos de compresión

Los ensayos de compresión permiten determinar la deformación de un material ante tensiones de compresión. De las curvas de tensión de compresión frente deformación se obtienen los parámetros que caracterizan las propiedades mecánicas de los materiales, tales como el *yield strength* o tensión de fluencia (YS), la máxima tensión a compresión (UCS) y la deformación plástica uniforme (ε_{plast}^u). Para la obtención de estos parámetros, primeramente se calculan los valores ingenieriles de tensión, σ_{ing} , y deformación, ε_{ing} , utilizando las dimensiones iniciales de las probetas, y a partir de éstos se obtienen los valores verdaderos, σ_v y ε_v , que caracterizan la deformación real que sufre la probeta en cada instante. Los valores de *yield strength* y de tensión máxima se han obtenido a partir de las curvas ingenieriles, mientras que los valores de deformación plástica uniforme se calcularon a partir de los valores de deformación verdaderos. De las curvas verdaderas se ha eliminado la parte elástica, pues de esta forma se elimina la contribución elástica del dispositivo experimental.

En la figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se presentan las curvas de tensión-deformación ingenieril y tensión verdadera-deformación plástica para las 3 familias de materiales. Los ensayos fueron realizados a temperatura ambiente sobre probetas cilíndricas con una relación longitud/diámetro de ~ 1.75 . Los parámetros más importantes obtenidos de estas curvas y que describen las propiedades mecánicas de los diferentes materiales se muestran en la tabla 4.3.

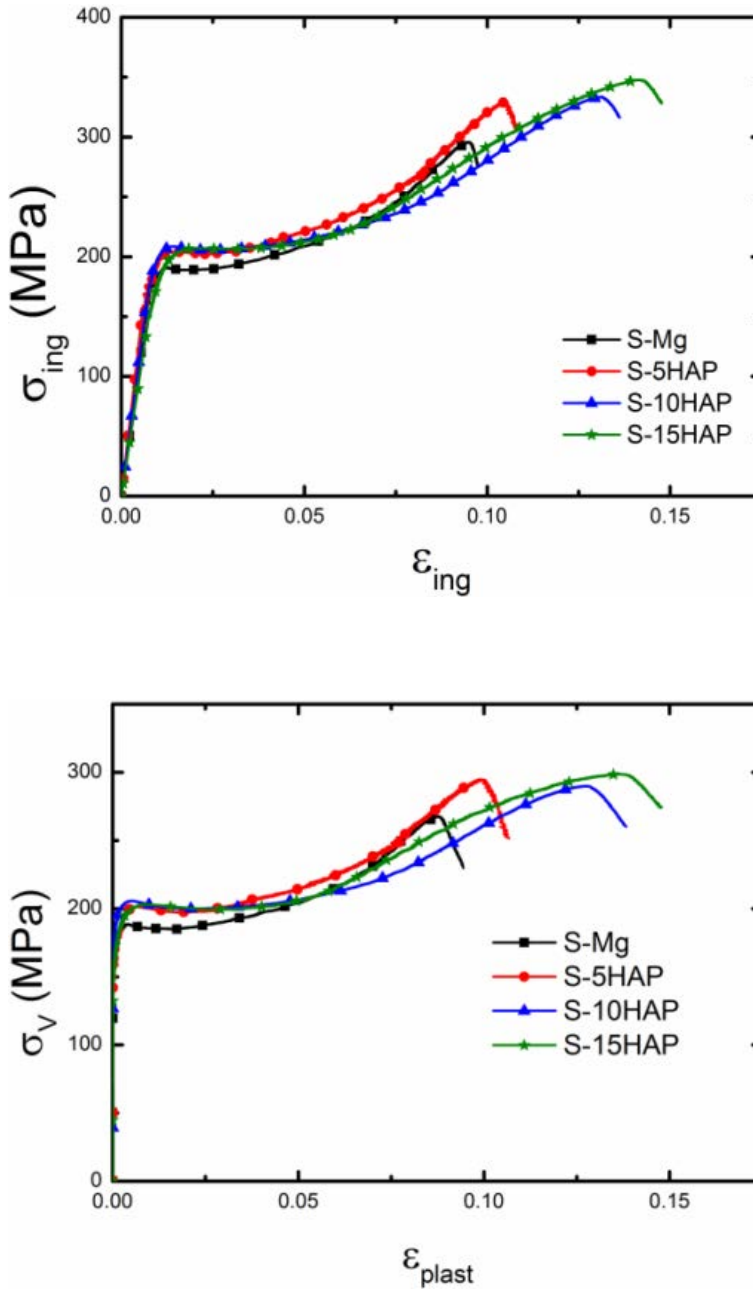


Figura 4.4. Curvas tensión-deformación ingenieril y verdadera para la familia S-xHAP.

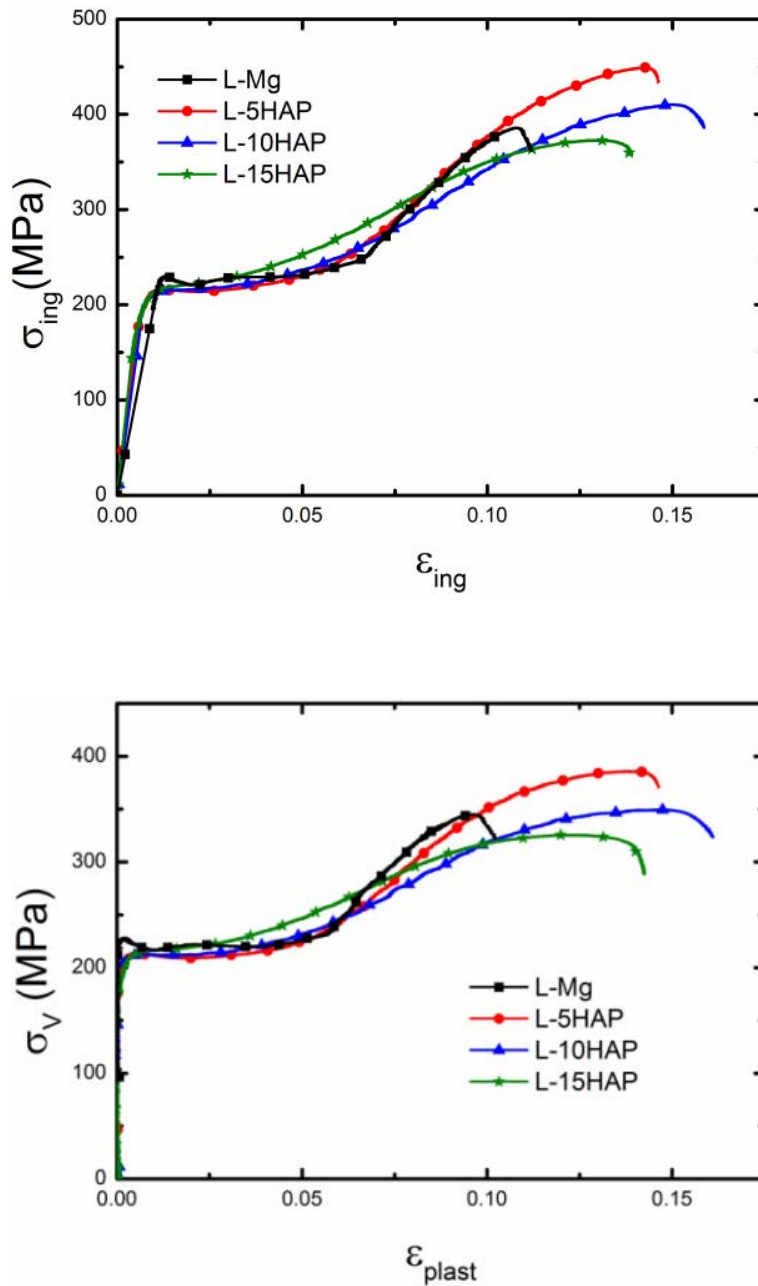


Figura 4.5. Curvas tensión-deformación ingenieril y verdadera para la familia L-xHAP.

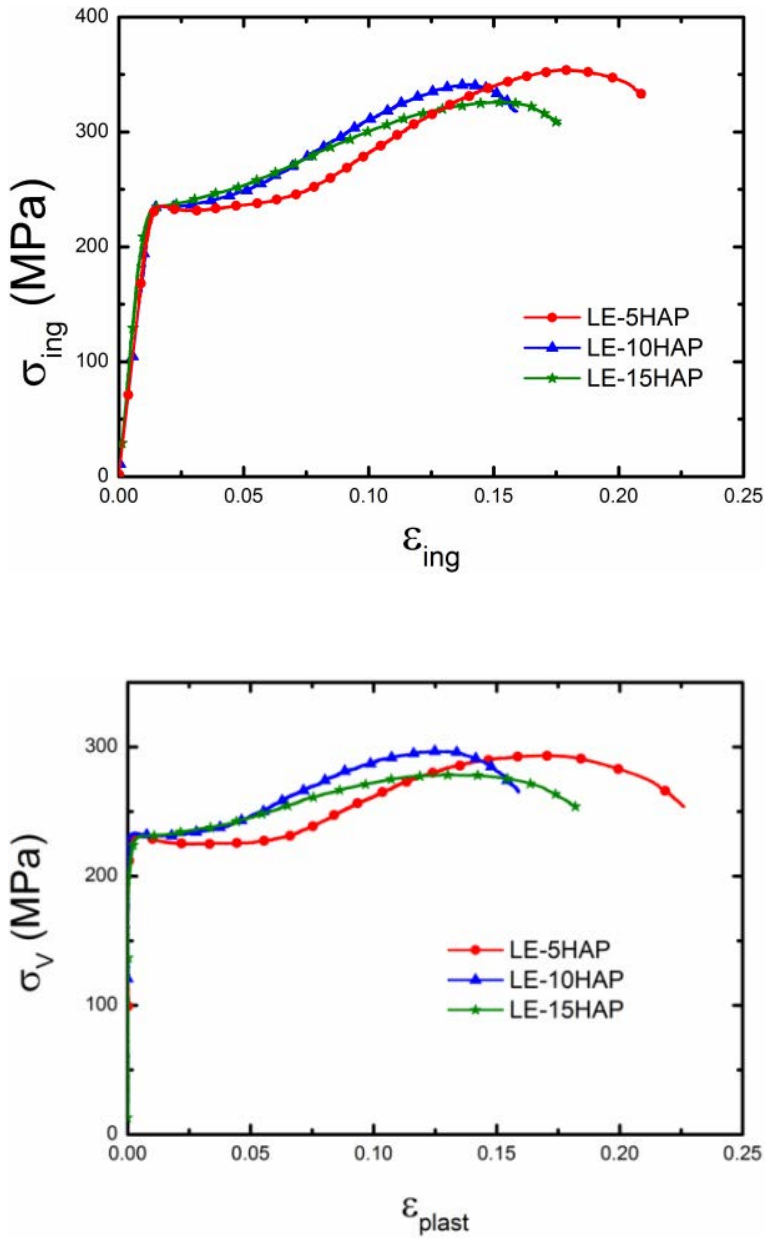


Figura 4.6. Curvas tensión-deformación ingenieril y verdadera para la familia LE-xHAP.

Material	YS (MPa)	UCS (MPa)	Deformación máxima uniforme
S-Mg	189	296	0.09
S-5HAP	202	329	0.10
S-10HAP	205	334	0.13
S-15HAP	207	348	0.14
L-Mg	220	386	0.10
L-5HAP	213	449	0.14
L-10HAP	215	410	0.15
L-15HAP	222	373	0.12
LE-5HAP	231	355	0.17
LE-10HAP	235	342	0.13
LE-15HAP	237	326	0.13

Tabla 4.3. Resumen de datos obtenidos de las curvas de compresión.

En todos los casos se observa en las curvas una zona inicial cóncava, que se atribuye a la formación de maclas de compresión ($1\ 0\ \bar{1}\ 2$) (Barnett, y otros 2004) (Sarker, Friedman y Chen 2015). En el caso de los materiales procesados por ECAP, LE-xHAP, se mantiene esta parte cóncava pero no es tan pronunciada como en los materiales L-xHAP y S-xHAP. En general, los materiales con empaquetamiento hexagonal compacto como es el Mg, presentan sistemas de deformación mecánica producidos por deslizamiento y maclado. Los deslizamientos se encuentran asociados a movimiento de los planos basales y prismáticos en la dirección basal $\langle a \rangle$, es decir, sin modificar su eje c. El maclado por el contrario se produce en planos piramidales en dirección no basal $\langle c + a \rangle$, lo cual convierte a este mecanismo de deformación en sistema preferente para materiales con el eje c perpendicular a la tensión aplicada en compresión (Wang y Huang 2007). Como se vio en el capítulo 3.2.4, estos materiales presentan una textura de fibra, donde el eje c de la celda hexagonal se encuentra perpendicular a la dirección de extrusión y en estos ensayos de compresión también perpendicular a la tensión que se aplica a las muestras. Al incorporar, tanto

partículas de HAP como el procesado mediante ECAP, se observó que se perdía la textura de fibra y disminuía su índice de textura.

En cuanto a los parámetros obtenidos de las curvas, tabla 4.3, se observa que la incorporación de las partículas de HAP en la matriz de Mg origina una mejora de las propiedades mecánicas en los materiales L-xHAP y S-xHAP respecto a los L-Mg y S-Mg. Esta mejora es relativamente pequeña para el YS y más acentuada para la UCS, y es más evidente en el caso del material de magnesio puro S-Mg. Se debe recordar que la comparación de las propiedades mecánicas del material de magnesio puro L-Mg con las del resto de los materiales de su familia debe hacerse con cautela puesto que sus condiciones de extrusión fueron ligeramente distintas (mayor relación de extrusión, 1:17, y menor temperatura, 350 °C). Por otro lado se observa que en el caso de los materiales de la familia L-xHAP la UCS disminuye al aumentar el contenido de HAP, mientras que en los materiales S-xHAP aumenta al aumentar el contenido de HAP. Esta diferencia de comportamiento se ha observado en distintos materiales ((Dobrzanski, Wlodarczyk y Adamiak 2005) (Litynska-Dobrzynka, y otros 2015) (Deng, y otros 2012)) y la atribuimos al efecto de la distinta morfología de los dos tipos de partículas de HAP empleadas y a su efecto en la microestructura.

El procesado ECAP aumenta significativamente el YS mientras que reduce la UCS. Se continúa observando la disminución del valor de UCS con el contenido en HAP.

4.2.1. Endurecimiento

Los materiales al someterse a tensiones sufren un endurecimiento por diferentes mecanismos, algunos relacionados con el movimiento, creación y aniquilación de dislocaciones. Este fenómeno se puede estudiar a partir del análisis de la parte plástica de las curvas de tensión-deformación verdaderas siguiendo la aproximación de Kocks-Mecking (Kocks y Mecking 2003).

Según esta aproximación, la velocidad de endurecimiento para materiales policristalinos, $\frac{d\sigma}{d\varepsilon} = \Theta$, sigue la relación de la ecuación 4.1:

$$(\sigma - \sigma_0) \frac{d\sigma}{d\varepsilon} = (\sigma - \sigma_0) [\Theta_h - \Theta_r(\sigma, \varepsilon, T)] \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde, σ_0 es el *yield strength*, Θ_h es la componente atómica de la velocidad de endurecimiento que está relacionada con el movimiento de dislocaciones y Θ_r es una componente asociada a efectos de ablandamiento, debidos a procesos de recuperación dinámica en los que se aniquilan las dislocaciones, bien por un aumento de la temperatura, de la tensión o la deformación.

En las figuras 4.7, 4.8 y 4.9 se representa la evolución del término $(\sigma - \sigma_0) \frac{d\sigma}{d\varepsilon}$ frente a $(\sigma - \sigma_0)$ para las diferentes familias de materiales. Los valores se calcularon a partir de las curvas compresión-deformación para el rango de valores de tensión entre la YS y la UCS de cada material.

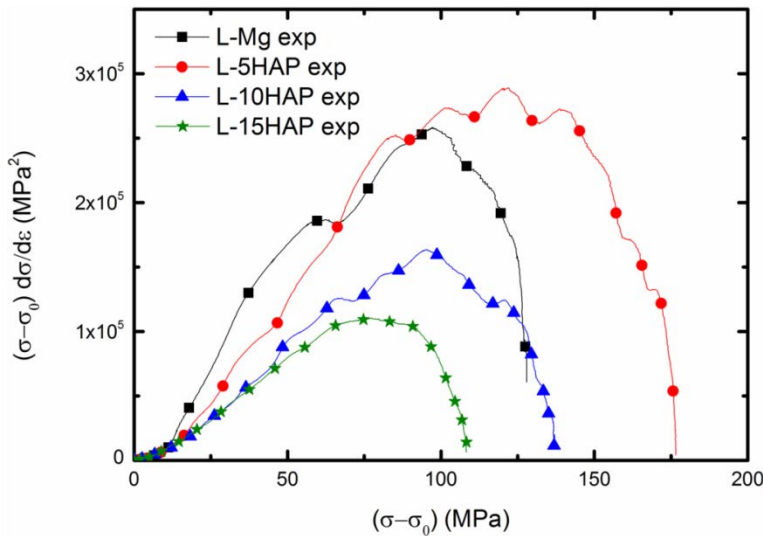


Figura 4.7. Curvas experimentales de endurecimiento para la familia L-xHAP.

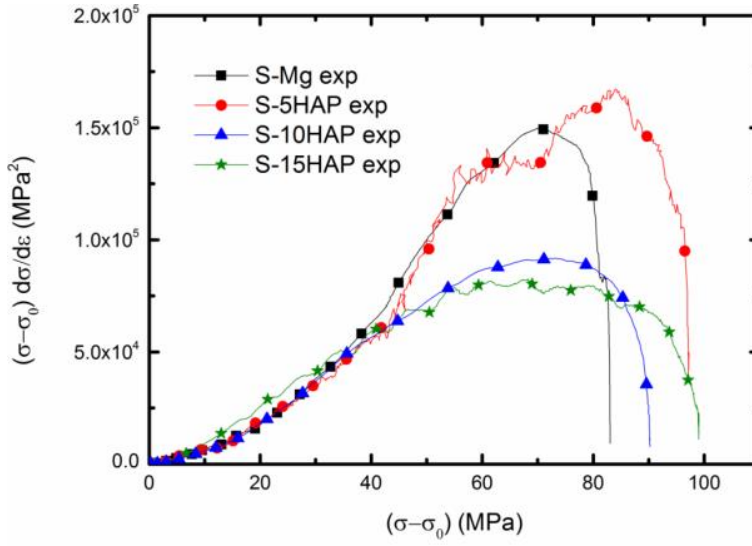


Figura 4.8. Curvas experimentales de endurecimiento para la familia S-xHAP.

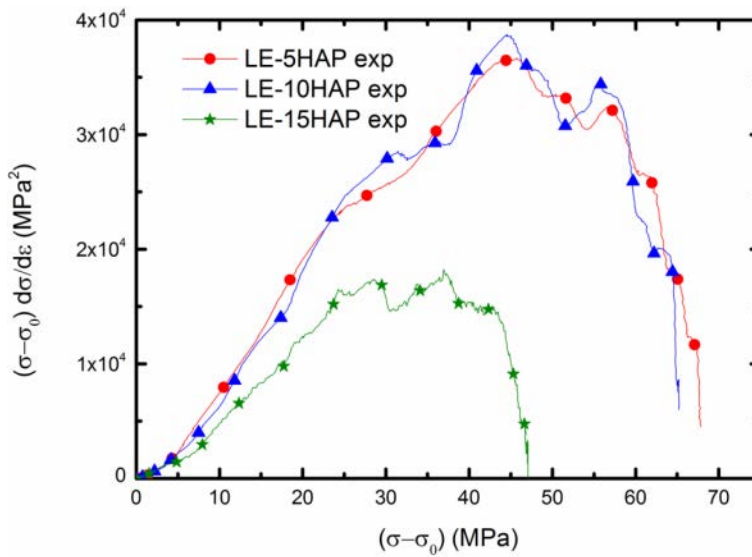


Figura 4.9. Curvas experimentales de endurecimiento para la familia LE-xHAP.

Como puede observarse en las figuras, las curvas presentan una apreciable dispersión. Con el fin de reducir la dispersión se optó por obtener las curvas siguiendo un procedimiento alternativo. En primer lugar, la zona de deformación plástica de las curvas compresión-deformación se ajustó mediante una función polinómica y, posteriormente, se determinó la derivada de las curvas obtenidas en los ajustes. El resultado obtenido se muestra en las figuras 4.10, 4.11 y 4.12. Si se comparan estas figuras con las anteriores puede apreciarse que este procedimiento no altera el comportamiento observado y disminuye considerablemente la dispersión. Junto a estos valores en cada gráfica se ha representado con una línea recta discontinua el comportamiento del endurecimiento teórico del Mg policristalino (Cáceres y Blake 2007).

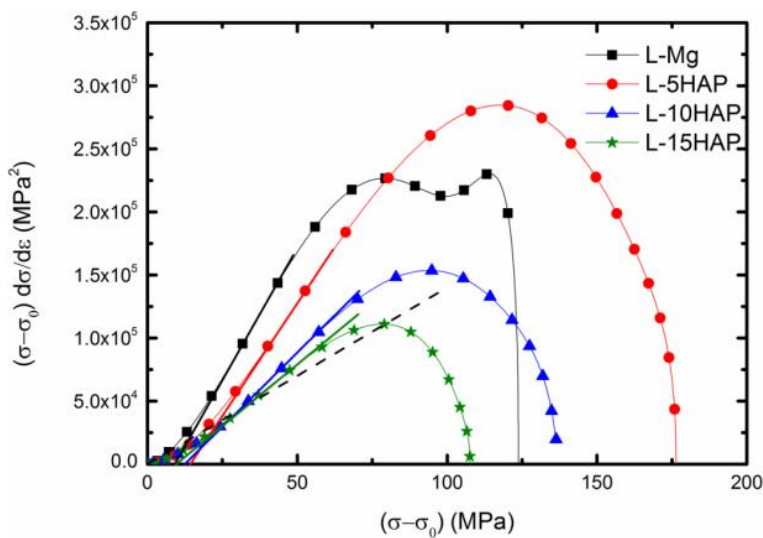


Figura 4.10. Curvas de endurecimiento de L-xHAP obtenidas a partir de las curvas compresión-deformación ajustadas. En línea discontinua se muestra la curva teórica del Mg policristalino.

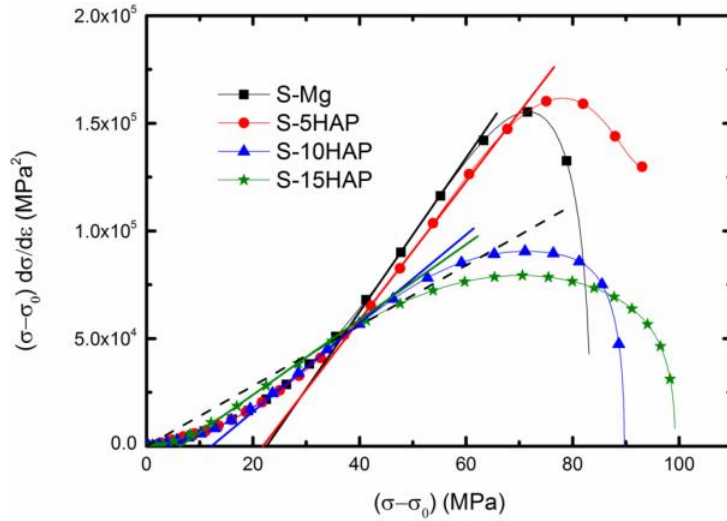


Figura 4.11. Curvas de endurecimiento de S-xHAP obtenidas a partir de las curvas compresión-deformación ajustadas. En línea discontinua se muestra la curva teórica del Mg policristalino.

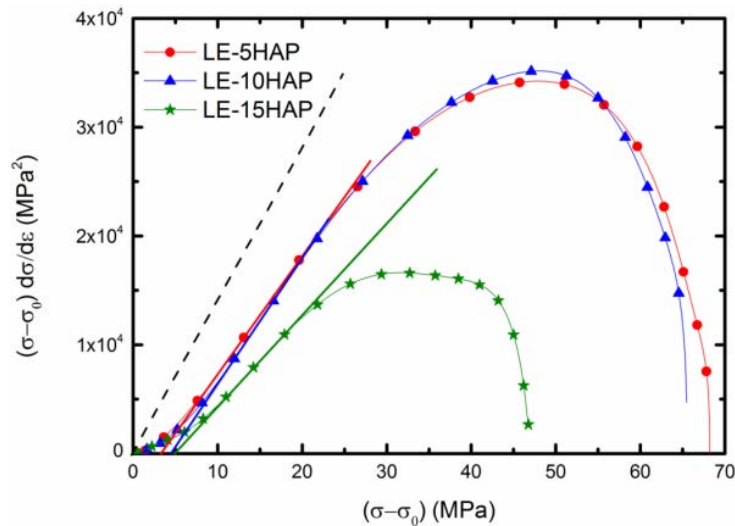


Figura 4.12. Curvas de endurecimiento de LE-xHAP obtenidas a partir de las curvas compresión-deformación ajustadas. En línea discontinua se muestra la curva teórica del Mg policristalino.

Según la ecuación 4.1, si en el proceso de endurecimiento sólo existe la componente atérmica Θ_h las curvas serán líneas rectas que pasarán por el origen. Incluso si se considera la existencia de ambas componentes Θ_h y Θ_r , a tensiones bajas la contribución de la componente de recuperación dinámica (ablandamiento) será despreciable, por lo que las curvas también presentarán un comportamiento lineal. A tensiones altas, la contribución de la componente de ablandamiento empieza a ser importante, y las curvas dejarán de mostrar un comportamiento lineal. Hay que destacar que las curvas de las figuras 4.10-4.12 no presentan un comportamiento lineal para valores pequeños de la tensión y no pasan por el origen. Algunos autores (Cáceres y Blake 2007) señalan que este comportamiento aparece cuando la deformación se produce por maclaje. Este fenómeno sucede especialmente en materiales con una estructura BCC o hexagonal compacta, como el Mg, en el que a baja temperatura o a bajas tensiones de deformación existen pocos sistemas de deslizamiento activos. A tensiones suficientemente mayores la deformación plástica ya se produce por movimiento de las dislocaciones, lo que conlleva una dependencia lineal de la curva de endurecimiento, que es lo que se observa en las curvas de todos los materiales estudiados. La pendiente del tramo recto de cada curva proporciona el valor de la componente atérmica Θ_h de la velocidad de endurecimiento. En la tabla 4.4 se muestran los valores obtenidos para los diversos materiales a partir del ajuste del tramo lineal. Puede observarse en las curvas que a medida que la velocidad de endurecimiento disminuye, el valor de la tensión de compresión necesaria para que se active el movimiento de dislocaciones también lo hace, lo que demuestra una disminución progresiva de la contribución de la deformación por maclaje al proceso de endurecimiento.

Material	Θ_h (GPa)
Mg policristalino (Cáceres y Blake 2007)	1.4
S-Mg	3.30
S-5HAP	3.17
S-10HAP	1.91
S-15HAP	1.65
LE-5HAP	1.07
LE-10HAP	1.10
LE-15HAP	0.79
L-Mg	4.10
L-5HAP	3.45
L-10HAP	2.37
L-15HAP	1.83

Tabla 4.4. Valores de la velocidad de endurecimiento de los diversos materiales, Θ_h , obtenidos a partir de la parte lineal de las curvas de endurecimiento.

Se puede observar que en los materiales L-xHAP y S-xHAP al aumentar el contenido de HAP el valor de Θ_h disminuye. Los valores de Θ_h entre 3 y 4 GPa se relacionan con la deformación producida en policristales por la combinación de deslizamientos de planos piramidales de tipo $\langle c + a \rangle$ y basales y prismáticos de tipo $\langle a \rangle$. Los valores más bajos, próximos a 1 GPa, se relacionan con deslizamientos de planos basales $\langle a \rangle$ (Cáceres y Lukac, Strain hardening behaviour and the Taylor factor of pure magnesium 2008). Por tanto se puede afirmar que la incorporación de HAP facilita los mecanismos de deformación asociados a movimientos de dislocaciones en planos basales.

Adicionalmente se observa que el procesado ECAP induce una intensa disminución de la velocidad de endurecimiento, obteniéndose

valores de Θ_h correspondientes a movimientos de dislocaciones en planos basales.

Basados en estos resultados se ha analizado la dependencia de la velocidad de endurecimiento con el índice de textura J , observándose una relación lineal entre Θ_h y el inverso del índice de textura J^{-1} , como evidencia la figura 4.13.

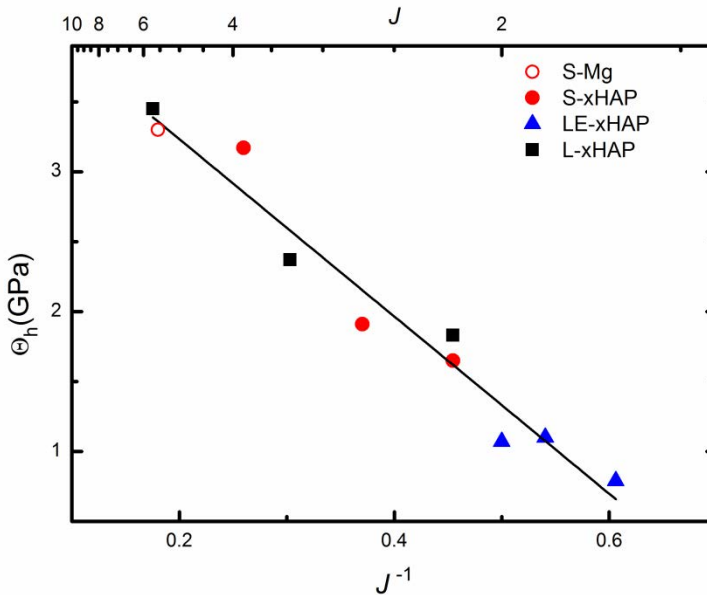


Figura 4.13. Relación entre endurecimiento y la inversa del índice de textura.

Esta relación indica que el proceso de endurecimiento es fuertemente dependiente de la orientación de los granos del material, puesto que ésta determina los mecanismos de deformación plástica que se pueden activar, lo que se conoce como *texture hardening*.

4.2.2. Maclado

Con el fin de comprobar la existencia de maclas originadas durante el proceso de deformación, se analizó la microestructura de algunas de las probetas tras los ensayos de compresión. Para ello, las muestras se cortaron en sección longitudinal y se atacaron durante 5 s con el reactivo utilizado para revelar fronteras de grano en el estudio de la microestructura, a partir de 1.5 g de ácido pícrico, 25 ml de etanol, 5 ml de ácido acético y 10 ml de agua destilada. En la figura 4.14 se muestran imágenes de microscopía óptica de la microestructura de los materiales S-Mg y S-15HAP. En ambos casos se observan maclas dentro de los granos, siendo mucho mayor la densidad en S-Mg que en S-15HAP.

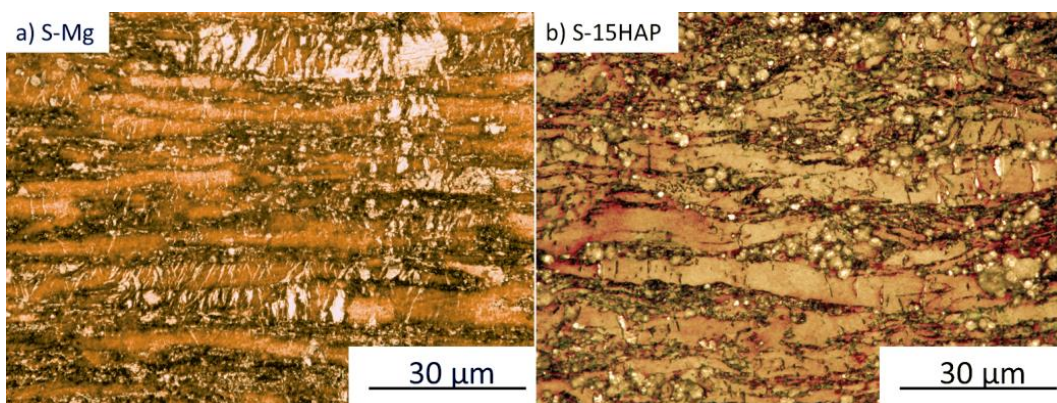


Figura 4.14. Imagen de microscopía óptica tras los ensayos de compresión. (a) S-Mg, (b)S-15HAP.

Esto significa que persiste un maclado en los granos del Mg, incluso después de la rotura de la muestra y haber pasado, por tanto, por efectos de recuperación dinámica (Sarker y Chen 2012). Se observa que la densidad de maclas disminuye al aumentar el contenido en HAP, lo que indica que la

presencia de partículas de HAP dificulta la reorganización de los granos de Mg.

4.2.3. Caracterización de la superficie de fractura

Después de la realización de los ensayos de compresión se observó mediante microscopía electrónica de barrido la superficie de fractura de las probetas ensayadas.

En la figura 4.15 se muestra una imagen de la superficie correspondiente a una de las probetas del material L-15HAP. En la imagen se pueden apreciar zonas donde se observa deformación plástica mientras que en otras no, lo que se puede concluir con una rotura mezcla de tipo dúctil y frágil. No se encontraron diferencias significativas entre los materiales.

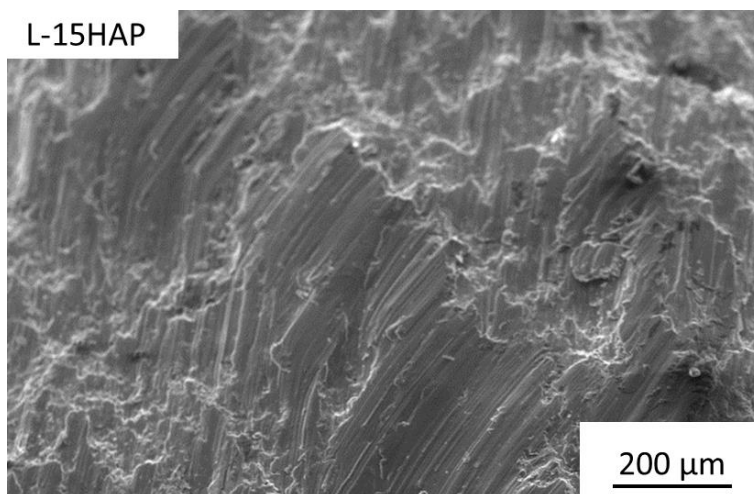
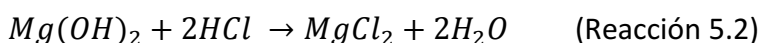
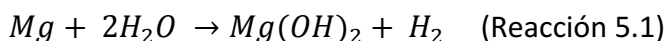


Figura 4.15. Imagen de SEM de la superficie de fractura de una muestra de L-15HAP en compresión.

Capítulo 5: Comportamiento a la Corrosión

5.1. Corrosión en NaCl: método a pH constante

Como se ha explicado en el capítulo 2.5.1, con este método se va a estudiar de una manera indirecta la resistencia a la corrosión intrínseca de los materiales en disolución acuosa de NaCl al 5%. Para ello, se mide el volumen de ácido que se necesita añadir para que se mantenga el pH de la disolución entre los valores de 5 y 7. Siguiendo la reacción 5.1, el Mg reacciona con los protones del agua, cediendo electrones y produciéndose H_2 (Tiwari y Bommarito 2002). La disminución de la concentración de protones en el medio provoca el aumento del pH y la formación y consecuente precipitación del $Mg(OH)_2$. Este hidróxido, a pesar de tener cierta solubilidad, cubre la superficie de los materiales, lo que reduce la exposición del Mg al electrolito (Taheri, y otros 2012) y por tanto su corrosión. La idea principal de este método de medida consiste en añadir un ácido al electrolito de modo que reaccione con el hidróxido, dando lugar a otros productos que poseen mayor solubilidad. En este caso se utilizó el ácido HCl. El ácido reacciona con el hidróxido de Mg produciendo $MgCl_2$, el cual posee una constante de solubilidad muy elevada, siguiendo la reacción indicada en 5.2. Además, al añadir el ácido, disminuye el pH del medio, lo que dificulta la formación de hidróxido. De esta manera se caracterizará la corrosión intrínseca de los composites, sin la presencia de la capa de hidróxido pseudo-protectora. Para poder controlar el valor del pH con mayor precisión se utilizó un ácido en baja concentración, 0.1 M. Para paliar el efecto de la disminución de la concentración total de iones Cl^- en el electrolito al añadir el ácido, se utilizó un volumen inicial de electrolito de 500 ml.



Puesto que los moles de Mg corroído que reaccionan con el número de moles de HCl añadidos están en relación 1:2, a partir del volumen de HCl medido, y conocida su concentración, se pueden calcular los moles de Mg que han reaccionado y, por tanto, la masa de Mg corroída en función en tiempo.

En las figuras 5.1, 5.2 y 5.3 se representa, para las diferentes familias de materiales, el volumen acumulado de ácido normalizado al área inicial de cada muestra, $\text{Vol}_{\text{HCl}}/\text{Area}_{\text{inicial}}$, en función del tiempo. El área inicial fue en todos los casos de $\sim 400 \text{ mm}^2$.

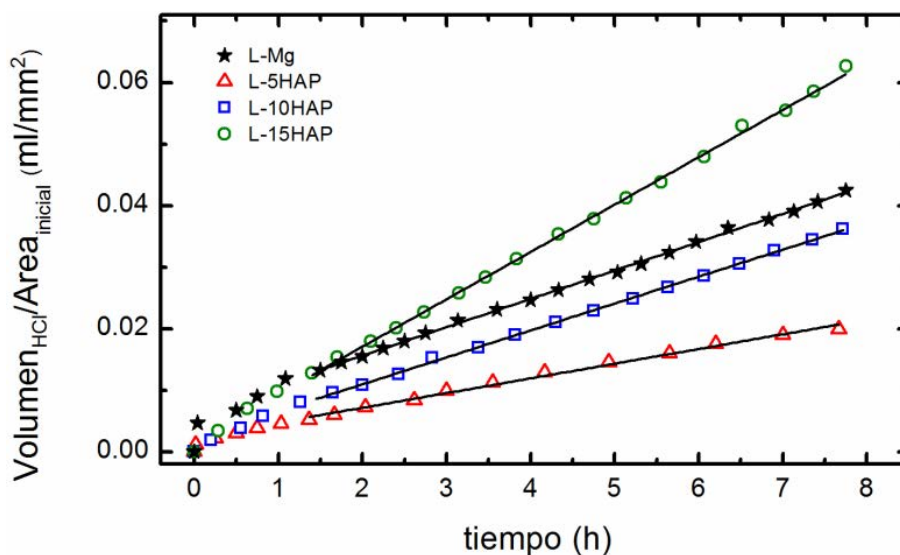


Figura 5.1. Volumen de HCl acumulado normalizado al área en función del tiempo en la familia de materiales L-xHAP. El pH se mantiene entre valores de 5 y 7.

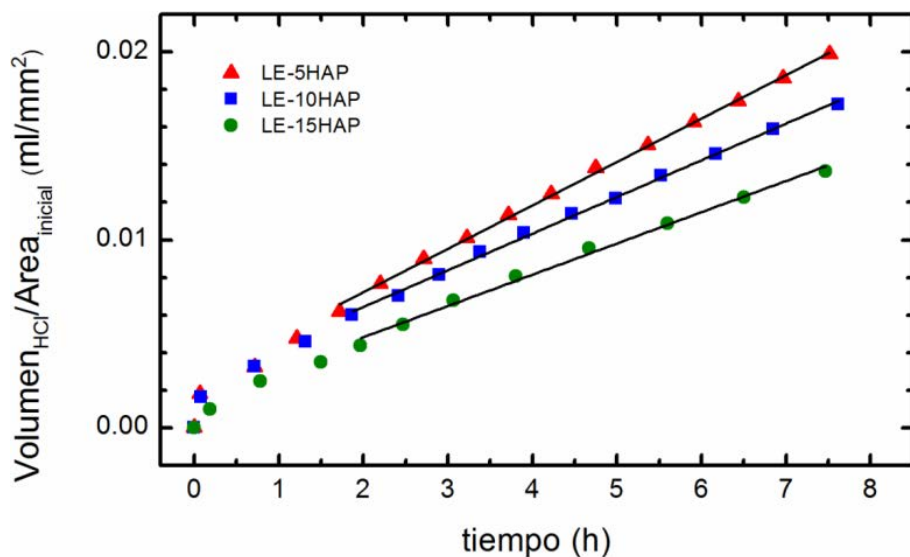


Figura 5.2. Volumen de HCl acumulado normalizado al área en función del tiempo en la familia de materiales LE-xHAP. El pH se mantiene entre valores de 5 y 7.

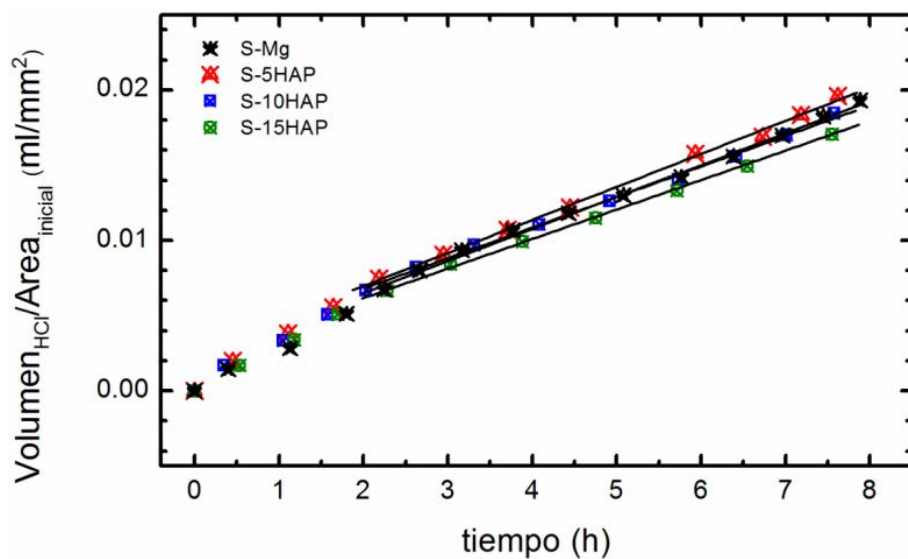
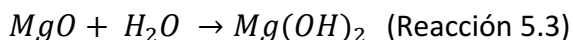


Figura 5.3. Volumen de HCl acumulado normalizado al área en función del tiempo en la familia de materiales S-xHAP. El pH se mantiene entre valores de 5 y 7.

Según las figuras 5.1, 5.2 y 5.3, las mayores diferencias entre los materiales de la misma familia se encuentran en los materiales L-xHAP; las diferencias entre los materiales LE-xHAP son muy pequeñas y el comportamiento es prácticamente el mismo en el caso de los S-xHAP. En todas las gráficas se pueden distinguir dos regiones: una primera, para $t < 1.5-2$ h en la que el ritmo de consumo de ácido no es constante y una segunda, para $t > 1.5-2$ h, en la que el comportamiento es lineal y el ritmo de consumo es inferior al de la etapa inicial. Esta última región sigue el comportamiento descrito por las reacciones 5.1 y 5.2. El comportamiento observado en las fases iniciales se atribuye a que el $Mg(OH)_2$ no se está produciendo únicamente por la reacción del Mg con el agua, sino también por la reacción del agua con el MgO que está presente en la superficie de las muestras, según la reacción 5.3 (Song y Unocic 2015).



Una vez que todo el MgO superficial reacciona, se observa la dependencia lineal esperada, característica de la resistencia a la corrosión del material estudiado. A tiempos suficientemente largos (no mostrados en las gráficas) los valores se desvían del comportamiento lineal, porque la corrosión está tan avanzada que el área de la superficie de material expuesta al electrolito es muy distinta al área inicial, lo que conduce a normalizaciones erróneas.

Del balance de masas de las reacciones 5.1 y 5.2 se obtiene la ecuación 5.1:

$$\frac{Vol_{HCl}}{Area} = \frac{2}{0.1 M_{Mg}} F_{CORR} t \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

donde M_{Mg} es la masa molar del Mg, 0.1 es la concentración molar de HCl utilizado y F_{CORR} es el llamado *factor de corrosión*. De esta manera F_{CORR} , con unidades mg/mm^2h , es proporcional a la pendiente de las rectas de los ajustes de los datos representados en las figuras 5.1-5.3. En la tabla 5.1 se muestran los valores de F_{CORR} obtenidos para los materiales de las distintas familias. Puesto que es habitual presentar los resultados de la resistencia a la corrosión por medio del parámetro *velocidad de corrosión*,

V_{CORR} , en unidades de mm/año, dichos valores también se incluyen en la tabla y son los que se muestran en la figura 5.4.

% HAP	L-xHAP		LE-xHAP		S-xHAP	
	F_{CORR} $\times 10^{-3}$ (mg/mm ² h)	V_{CORR} (mm/año)	F_{CORR} $\times 10^{-3}$ (mg/mm ² h)	V_{CORR} (mm/año)	F_{CORR} $\times 10^{-3}$ (mg/mm ² h)	V_{CORR} (mm/año)
0	5.6±0.2	30.1 ± 1.1	-	-	2.41±0.11	12.3±0.6
5	2.96±0.14	15.1±0.7	2.83±0.11	14.1±0.5	2.65±0.12	13.2±0.6
10	3.55±0.15	17.8±0.8	2.41±0.09	11.9±0.5	2.34±0.09	11.6±0.4
15	9.3±0.3	46.6±1.5	2.14±0.12	10.3±0.6	2.32±0.11	11.3±0.5

Tabla 5.1. Valores del factor de corrosión y de la velocidad de corrosión.

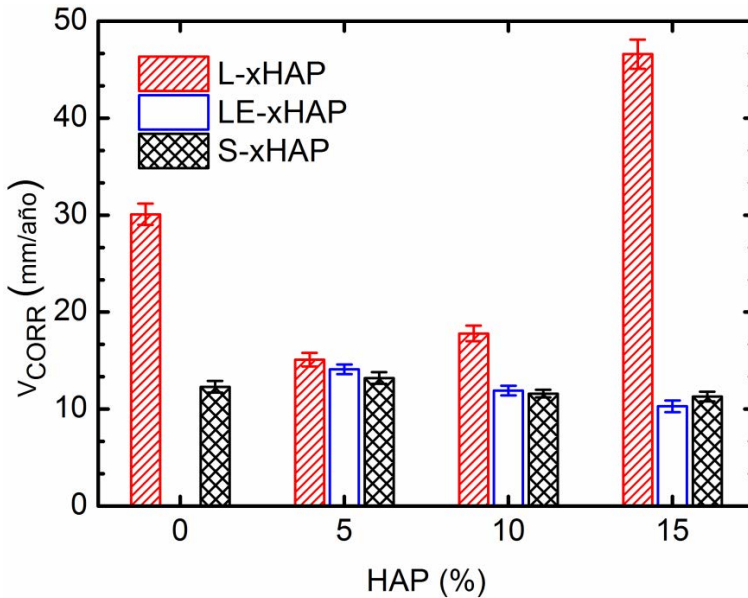


Figura 5.4. Velocidad de Corrosión en función del contenido en HAP para los diferentes materiales.

Los resultados indican que cambios en la microestructura originan cambios en las propiedades de los materiales y entre ellas, en la resistencia a la corrosión. En este sentido, los principales factores que afectan a la corrosión son el tamaño y la forma del grano, la presencia y distribución de segundas fases, la porosidad y la rugosidad. A continuación se resume cómo afecta cada uno de estos factores a la resistencia a la corrosión.

- a) La densificación del material, que viene determinada por las características de las partículas de HAP y el tipo de procesado, se relaciona inversamente con la porosidad interna. Al aumentar la densificación se reduce el área de material expuesta a ser corroída, disminuyendo el factor de corrosión.
- b) El contenido en partículas de HAP, que al ser partículas estables en disoluciones neutras-básicas pueden actuar de barrera para la corrosión.
- c) El contenido de MgO del material, el cual puede reaccionar con el medio mediante la reacción 5.3. Con esta reacción se producirá hidróxido y se alterará el balance de consumo de ácido.
- d) El tamaño de grano, cuya influencia en Mg puro y en sus aleaciones no está del todo clara, puesto que se han encontrado resultados contradictorios (Argade, Panigrahi y Mishra 2012), (Song, y otros 2010)y (Aung y Zhou 2010). Sin embargo, los defectos asociados a las fronteras de grano parecen ser puntos de nucleación para la formación de la capa protectora de Mg(OH)_2 . Así, tamaños de grano menores favorecerían una mayor resistencia a la corrosión. En este caso, puesto que se ha impedido la formación de la capa protectora, éste no sería un factor a tener en cuenta.
- e) Textura del material, que conduce a la orientación preferencial de planos cristalográficos del Mg con distinta resistencia a la corrosión. Diferentes trabajos muestran que los planos $(0\ 0\ 0\ 1)$ presentan mayor resistencia a la corrosión que los planos $(1\ 0\ \bar{1}\ 0)$ y $(1\ 0\ \bar{1}\ 2)$ ((Song, Mishra y Xu 2010), (Liu, y otros 2008) y (Xin, y otros 2011)), lo que se asocia a su mayor empaquetamiento.

La tabla 5.2 incluye los valores de los parámetros necesarios para analizar cuáles de estos factores determinan la velocidad de corrosión de nuestros materiales. Para facilitar el seguimiento de la discusión, en la tabla solo se incluyen los parámetros más relevantes.

Material	ρ/ρ_{cal} (%)	Indice de textura J	V_{CORR} (mm/año) NaCl
S-Mg	98.8	5.55	12.3
S-5HAP	98.9	3.85	13
S-10HAP	96.9	2.70	11.6
S-15HAP	96.4	2.20	11.3
LE-5HAP	97.7	2.00	14
LE-10HAP	97.6	1.85	12
LE-15HAP	98.0	1.65	10
L-Mg	93.8	4.62	30.1
L-5HAP	96.4	5.70	15.1
L-10HAP	96.0	3.30	17.8
L-15HAP	94.0	2.20	46.6

Tabla 5.2. Densificación, índice de textura y velocidad de corrosión.

Si analizamos el efecto de la porosidad, podemos ver que en líneas generales los materiales con un nivel de densificación menor poseen mayor velocidad de corrosión. Este efecto es claramente patente cuando se comparan las familias de materiales L-xHAP y LE-xHAP. El tratamiento ECAP reduce considerablemente la porosidad de los materiales, en especial del que contiene un 15% de HAP, para el que la velocidad de corrosión se reduce de 46.6 mm/año a 10 mm/año.

La comparación entre estas dos familias de materiales también nos permite analizar el efecto de la textura. Un valor más grande del índice de textura indica una mayor proporción de planos basales (0 0 0 1) paralelos a

las superficies de las muestras expuestas al medio. Como ya se ha comentado, estos planos son más resistentes a la corrosión. A pesar de que los composites ECAPeados muestran un grado de textura menor que sus correspondientes sin ECAPear, la velocidad de corrosión es menor, lo que indica que la textura es un factor menos determinante que la porosidad en su resistencia a la corrosión.

Por último lugar, la presencia de HAP parece favorecer la resistencia a la corrosión, como lo demuestra la disminución de la velocidad de corrosión con el contenido de HAP en las familias LE-xHAP y S-xHAP.

De este análisis se concluye que el factor dominante que controla este proceso es la porosidad del material, como se puede observar en la figura 5.5, donde cada material de cada familia se identifica por un color y por su contenido en hidroxapatita.

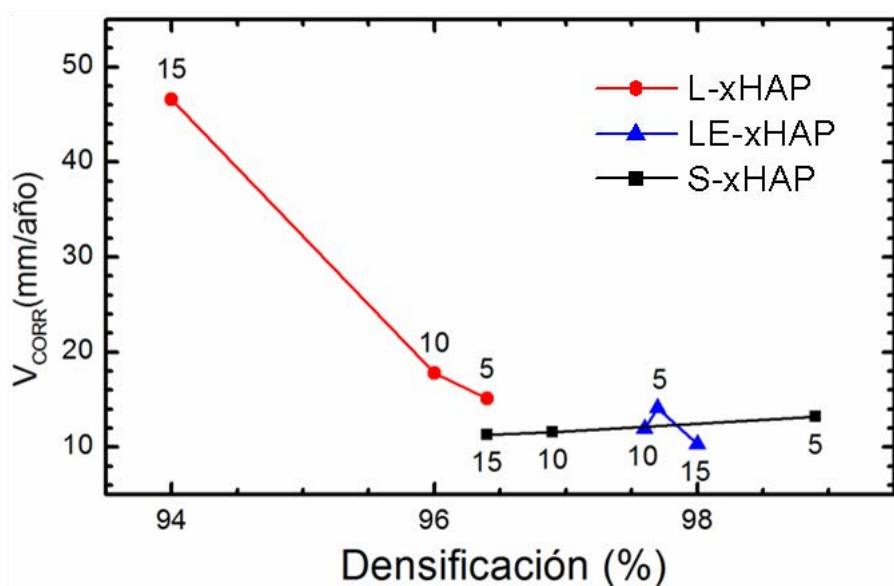


Figura 5.5. Velocidad de corrosión frente a la densificación.

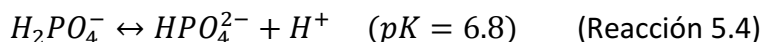
5.2. Corrosión en medios biológicos: método de evolución de H₂

Este método indirecto se utilizó con electrolitos más complejos en composición que el usado en el apartado anterior y que tienen mayor semejanza a entornos biológicos, lo cual es importante para la posible aplicación de estos materiales como implantes temporales.

El trabajar con electrolitos más complejos añade un mayor número de factores que influyen en la corrosión, como por ejemplo reacciones secundarias entre algún componente del electrolito y el material a estudiar. Para evitar estos problemas, la resistencia a la corrosión se ha caracterizado midiendo el volumen de H₂ que se produce como resultado de la reacción de corrosión 5.1 en función del tiempo (Shi y Atrens 2011). Manteniendo la temperatura de todo el sistema constante se mide el volumen y la presión del gas producido en función del tiempo. Así, considerando el H₂ como un gas ideal se pueden determinar los moles de H₂ producidos y calcular los moles de Mg corroídos.

5.2.1. Electrolito Phosphate Buffered Saline (PBS)

La primera aproximación a entornos biológicos se realizó con la solución tampón Phosphate Buffered Saline (PBS) a una temperatura constante de 37 °C. Esta disolución está compuesta de cloruros y fosfatos de sodio y potasio. La concentración de estos iones es similar a la del líquido extracelular en los mamíferos y el tampón fosfato es el encargado de regular el pH mediante la reacción 5.4.



Las pastillas de PBS comercial están preparadas para mantener el pH en 7.4, que es el pH fisiológico. Para ese pH, la concentración de iones HPO_4^{2-} es 4 veces mayor a la de iones H_2PO_4^- , por lo que es considerado un buen sistema para amortiguar ácidos, y aunque no tan bueno para amortiguar pH básicos, es mejor que otros tampones, como el bicarbonato donde la concentración de base es 20 veces mayor a la de ácido.

Como ya se ha descrito, al producirse la reacción de corrosión el Mg se oxida cediendo electrones a los protones del medio de manera que se forma H_2 y aumenta el pH. Para compensar el déficit de protones, el tampón fosfato desplaza su equilibrio hacia la derecha en la reacción 5.4 liberando protones al medio. La capacidad de amortiguación disminuye a medida que el contenido en ácido también lo hace, hasta que se rompe el tampón y, en consecuencia, el pH sube bruscamente. Dada la naturaleza del tampón y debido a las especies HPO_4^{2-} y PO_4^{3-} , se alcanzaría otro equilibrio a pH ~ 12 . Sin embargo, a pH ~ 10 la capa del $\text{Mg}(\text{OH})_2$ formado sobre la superficie del material frena la corrosión, estabilizándose el pH (Song y Atrons 2003). Esta capa de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ es frágil y está sometida a tensiones laterales, por lo que se producen grietas que dejan nuevamente parte de la superficie de Mg expuesta al electrolito, continuando así la reacción de corrosión. Por tanto, en una primera aproximación, la velocidad de corrosión del material, V_{CORR} , va a estar relacionada con el tiempo transcurrido hasta que se rompe el equilibrio inicial del tampón fosfato a pH 7.4.

En las figuras 5.6, 5.7 y 5.8 se presenta la evolución del pH durante 100 h para las tres familias de materiales. En el caso de la familia L-xHAP, el mejor comportamiento corresponde al del composite con un contenido de un 5% de HAP, para el que no se observa la rotura del pH hasta pasadas 90 h y el peor al del material con 15%, para el que se observa la rotura pasadas 36 h. Sin embargo, esta situación se invierte tras el tratamiento ECAP, que mejora apreciablemente el comportamiento de los materiales con 10 y 15% de HAP. La familia S-xHAP mantiene durante las 100 h un valor de pH prácticamente constante e igual al inicial, lo que en primera aproximación indica una mayor resistencia a la corrosión.

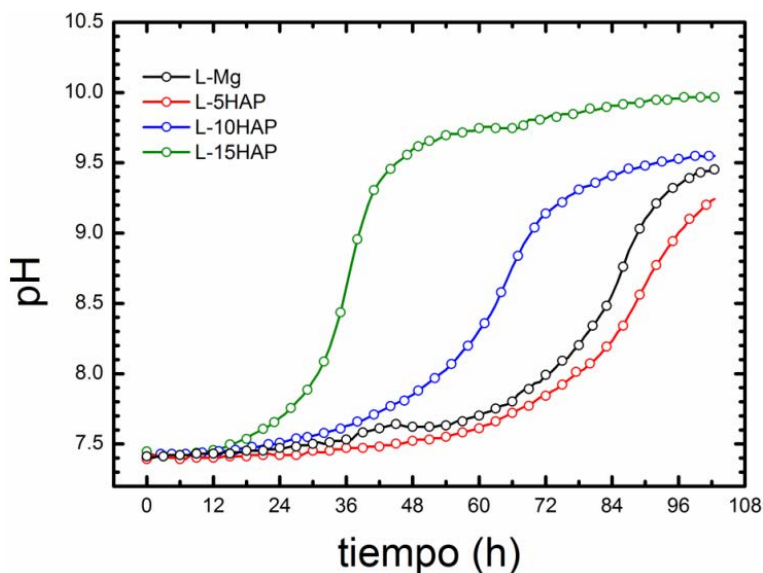


Figura 5.6. Evolución del pH durante la corrosión en PBS de la familia de materiales L-xHAP a lo largo de 100h.

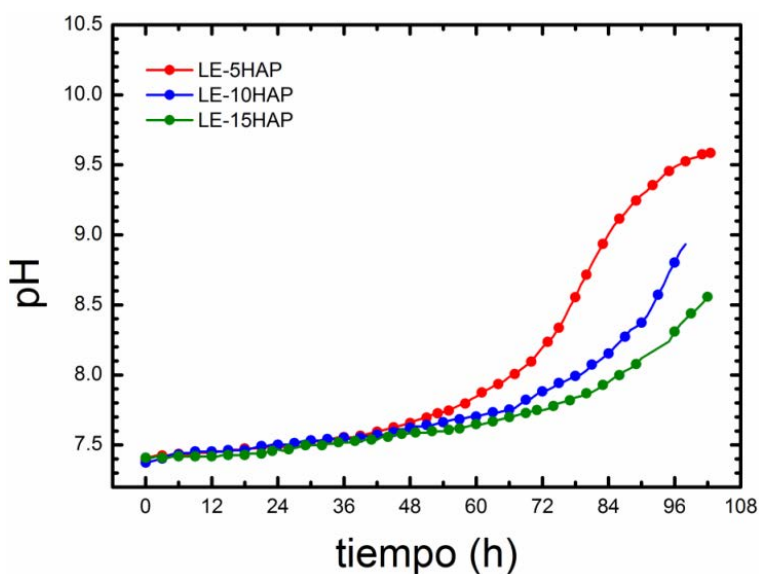


Figura 5.7. Evolución del pH durante la corrosión en PBS de la familia de materiales LE-xHAP a lo largo de 100h.

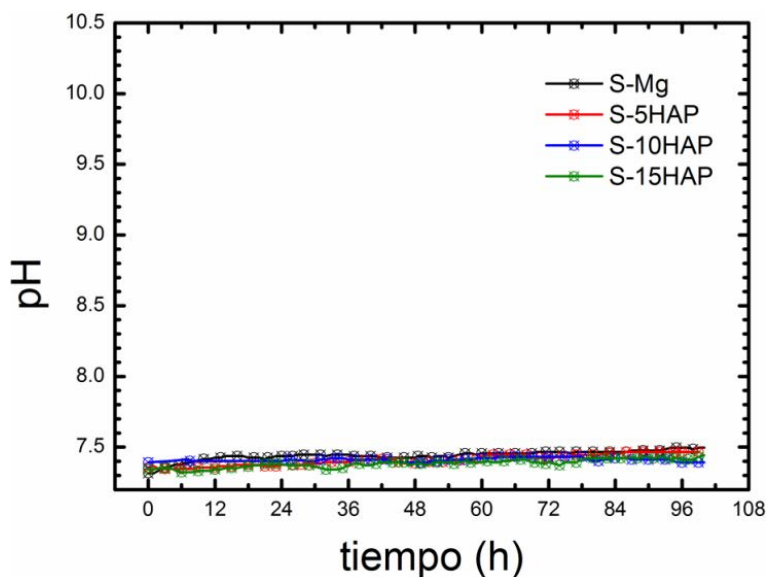


Figura 5.8. Evolución del pH durante la corrosión en PBS de la familia de materiales S-xHAP a lo largo de 100h.

Simultáneamente se ha medido el volumen acumulado de H_2 producido por la reacción de corrosión en función del tiempo. Los resultados se muestran en las figuras 5.9, 5.10 y 5.11, habiéndose normalizado el volumen al área inicial (Vol_{H_2}/A).

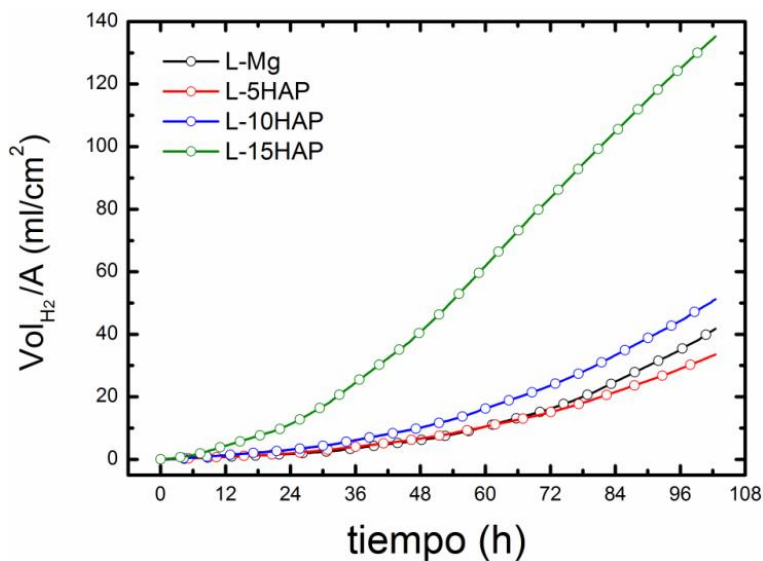


Figura 5.9. Volumen acumulado de H₂ producido normalizado al área de material frente al tiempo para la familia L-xHAP.

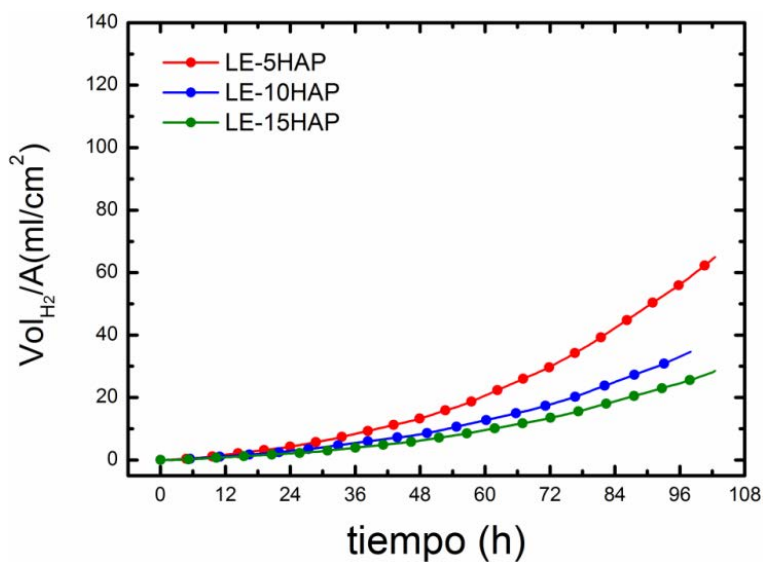


Figura 5.10. Volumen acumulado de H₂ producido normalizado al área de material frente al tiempo para la familia LE-xHAP.

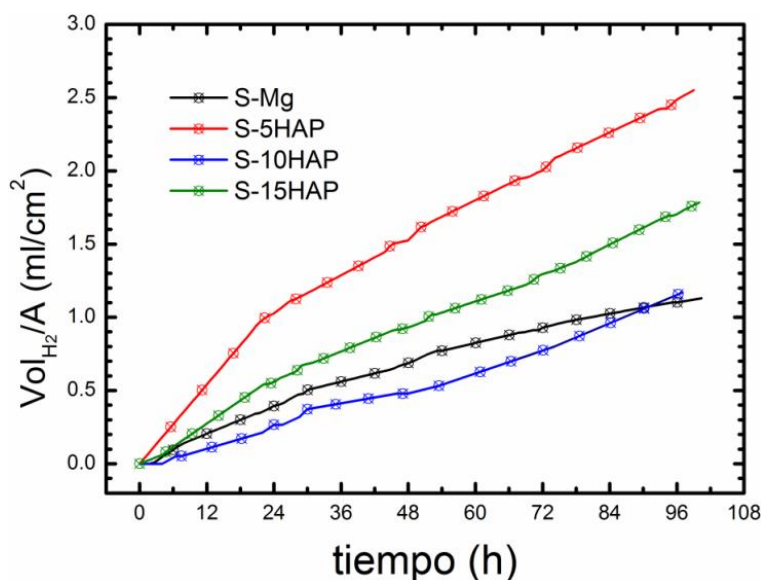


Figura 5.11. Volumen acumulado de H₂ producido normalizado al área de material frente al tiempo para la familia S-xHAP.

Los resultados indican que la evolución del volumen de H₂ producido sigue la misma tendencia que la observada para el pH. A partir del volumen de H₂ y del cálculo de la presión del gas se determina el número de moles de H₂ producido, lo que permite calcular la masa de Mg corroída en función del tiempo. A partir de la expresión 5.2, que relaciona el volumen de hidrógeno normalizado al área con el tiempo se obtiene la velocidad de corrosión, V_{CORR} , expresada en mm/año. Esta velocidad de corrosión es proporcional al valor de la pendiente de las gráficas para cada tiempo:

$$\frac{Vol_{H_2}}{A} = \frac{V_{CORR}}{2.0074} \cdot t \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

donde $\frac{Vol_{H_2}}{A}$ es el volumen de H_2 producido durante la corrosión normalizado al área de las muestras en ml/cm^2 , t es el tiempo en h y 2.0074 es una constante calculada teniendo en cuenta la presión media del gas dentro de la bureta, la temperatura y la densidad del Mg. Las curvas obtenidas de la velocidad de corrosión (V_{CORR}) se representan en las figuras 5.12, 5.13 y 5.14 para las diferentes familias.

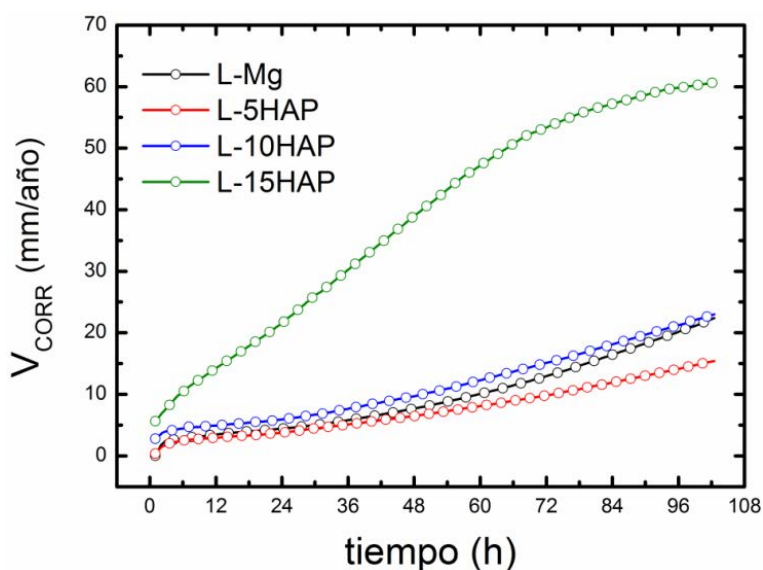


Figura 5.12. Velocidad de corrosión de la familia L-xHAP en PBS en función del tiempo.

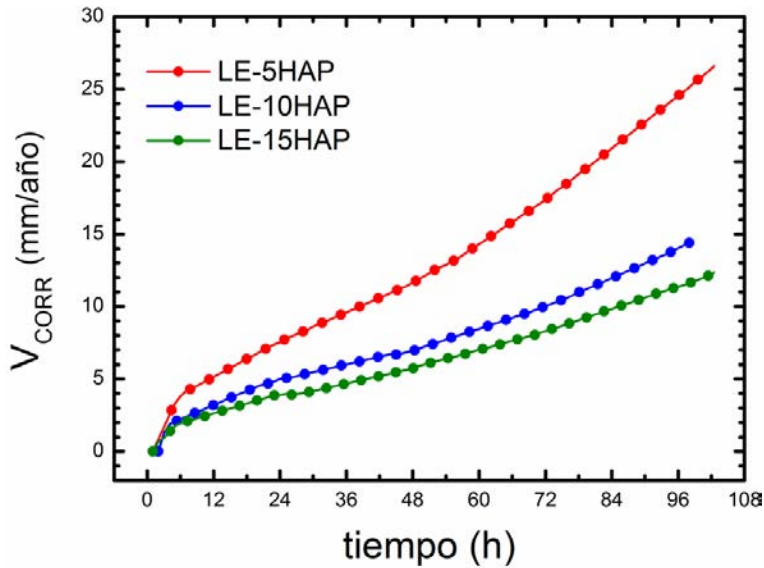


Figura 5.13. Velocidad de corrosión de la familia LE-xHAP en PBS en función del tiempo.

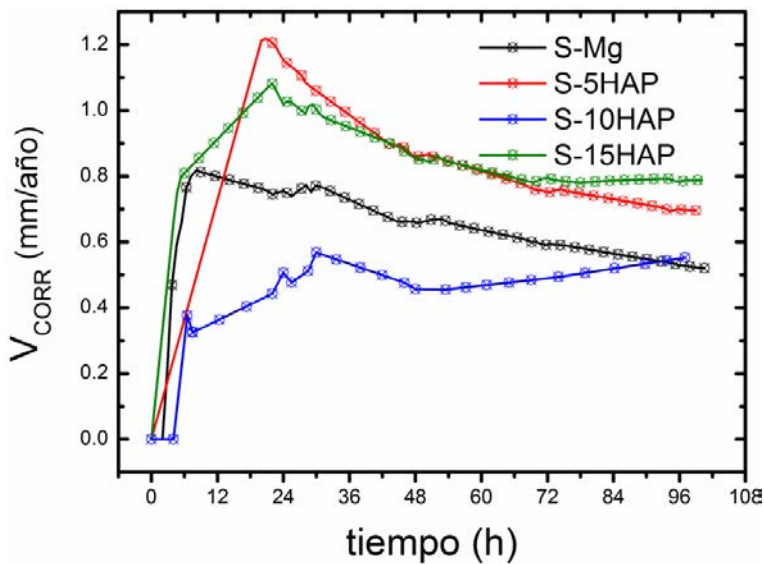


Figura 5.14. Velocidad de corrosión de la familia S-xHAP en PBS en función del tiempo.

Los resultados indican que los materiales L-xHAP son los menos resistentes a la corrosión y los S-xHAP los más resistentes. Al igual que con el método estudiado en el apartado anterior, la mayor variación entre los materiales de una misma familia se encuentra en la familia L-xHAP, mientras que son menores las diferencias en las familias LE-xHAP y S-xHAP. Es importante señalar que para estos últimos materiales se observa una disminución de la velocidad de corrosión a partir de aproximadamente 20 h. El procesado ECAP mejora la resistencia a la corrosión para todas las composiciones, especialmente en el material L-15HAP para el que se reduce su velocidad de corrosión en un factor ~ 6 . Puesto que el efecto principal del procesado ECAP es la reducción de la porosidad, se atribuye la baja resistencia a la corrosión de los materiales L-xHAP a su alta porosidad. Sin embargo, si se compara el comportamiento a la corrosión de las muestras ECAPeadas con el de las muestras S-xHAP, que tienen un grado de porosidad semejante, concluimos que éste no es el único factor determinante. Otro factor importante va a estar relacionado con la textura. En las muestras extruidas existe una mayor densidad de planos compactos expuestos al medio corrosivo, los cuales, como ya se comentó en el apartado 5.1, son los más resistentes a corroerse, mientras que, al disminuir la textura con ECAP otros planos no tan compactos están expuestos a la corrosión.

Para analizar con más detalle la resistencia a la corrosión, las curvas anteriores se han derivado respecto al tiempo, lo que representa la aceleración de corrosión, A_{CORR} . Los resultados se muestran en las figuras 5.15-5.17.

Al igual que en el estudio de la corrosión en NaCl a pH constante, se observa en todos los casos un aumento más elevado de la velocidad de corrosión en las primeras horas de inmersión, lo que se relaciona con las características del acabado superficial. En este caso los principales factores a tener en cuenta en el análisis de la resistencia a la corrosión son:

- a) La densificación del material en función del procesado y las características de las partículas de HAP. Al aumentar la densificación

del material se reduce el área expuesta a la corrosión, disminuyendo la velocidad de corrosión.

- b) El contenido en partículas de HAP. Al ser estables en este tipo de disolución básica pueden actuar de barrera para la corrosión. Al aumentar el contenido en HAP se disminuye la velocidad de corrosión.
- c) La textura del material, que determina la exposición de determinados planos al medio de corrosión. A mayor índice de textura existen una mayor densidad de planos resistentes a la corrosión y por lo tanto disminuye la velocidad de corrosión.
- d) La capa pseudo-protectora de hidróxido que se forma en la superficie expuesta a corrosión y el pH de la disolución que permite estabilizarla. Al crecer la capa de hidróxido más tensiones existirán entre el material y el hidróxido, favoreciendo el agrietamiento de esta capa y aumentando la superficie expuesta a la corrosión.

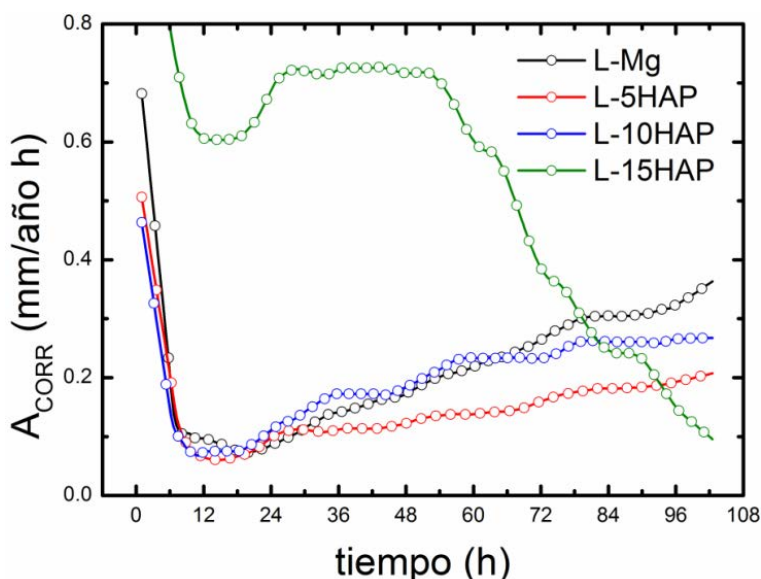


Figura 5.15. Aceleración de la corrosión frente al tiempo para la familia de materiales L-xHAP.

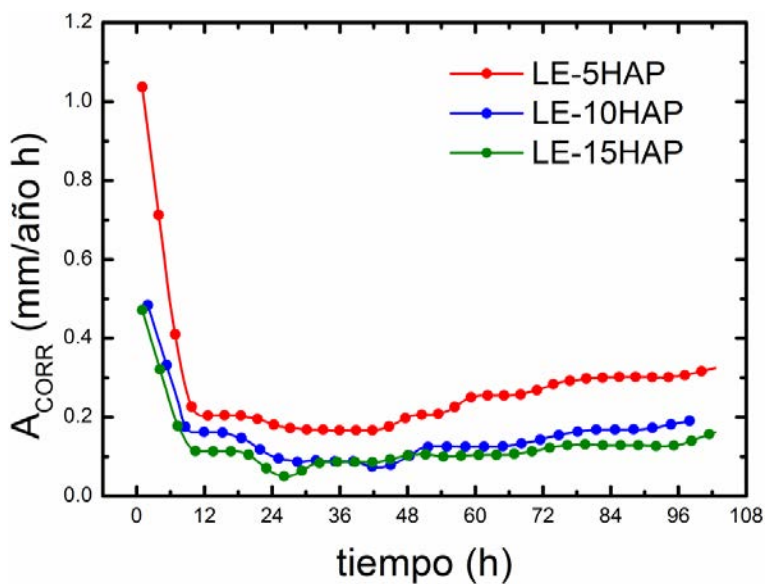


Figura 5.16. Aceleración de la corrosión frente al tiempo para la familia de materiales LE-xHAP.

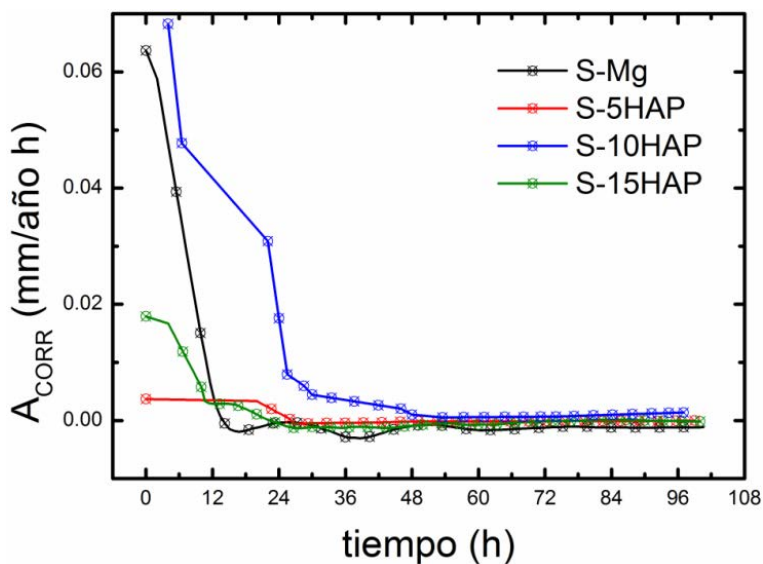


Figura 5.17. Aceleración de la corrosión frente al tiempo para la familia de materiales S-xHAP.

Los materiales L-xHAP, que presentan los menores valores de densificación, son los que muestran las mayores velocidades y aceleraciones de corrosión. El hecho de tener planos más resistentes expuestos al medio no es suficiente para frenar la corrosión. Una mayor cantidad de poros internos en el material origina una mayor exposición de superficie al medio. Este factor de densificación del material va a ser determinante, como ya se demostró en el capítulo 5.1 con las medidas realizadas en medio de NaCl con el método a pH constante. En el caso del material L-15HAP, se observa que, durante el tiempo en que se produce la rotura del tampón, la aceleración a la corrosión se mantiene constante debido a que el tampón cambia de reacción para proporcionar protones. Posteriormente, se observa como la velocidad de corrosión disminuye ya que el pH ~ 10 mantiene muy estable la capa de hidróxido formada sobre el material.

En los materiales LE-xHAP se observan valores de velocidades y aceleraciones de corrosión menores pero cercanos a los de los materiales sin ECAPear, excepto en el caso del composite con 5% de contenido en HAP para el que dichos valores aumentan. El grado de densificación de los tres materiales ECAPeados es similar, sin embargo para el material con 5% de HAP su índice de textura disminuye de 5.7 a 2.0 con el procesado ECAP, y para los materiales con 10% y 15% en HAP lo hace de 3.3 a 1.85 y de 2.2 a 1.65, respectivamente. Estos resultados corroboran que la pérdida de la textura de fibra con el tratamiento ECAP es también un factor decisivo en la resistencia a la corrosión, puesto que aumenta la proporción de planos no compactos, y menos resistentes, que quedan expuestos a la reacción con el medio acuoso. Este índice de textura también disminuye con la incorporación de partículas de HAP, pero, sin embargo, se observa en la familia LE-xHAP menor velocidad de corrosión al aumentar el contenido en HAP, lo que indica que las partículas de HAP actúan como barrera a la corrosión.

Los materiales S-xHAP presentan los valores de velocidad de corrosión menores. Estos materiales presentan altas densificaciones y mayor densidad de planos resistentes a la corrosión expuestos al medio. Pasado el tiempo inicial, la velocidad de corrosión aumenta hasta

aproximadamente las 20 primeras horas. En este tiempo se han formado sobre la superficie de los materiales las primeras capas de hidróxido de Mg, dando lugar a una barrera muy eficaz a la corrosión, llegando al punto de disminuir su velocidad de corrosión a valores muy estables por debajo de 1 mm/año, y aceleración igual a cero. No se observa una correlación con el contenido en HAP, pero la baja porosidad y sus valores de índice de textura proporcionan suficiente estabilidad en la capa pseudo-protectora para que no se formen apenas grietas que permitan aumentar la corrosión.

La estabilidad de la capa de hidróxido va a estar influenciada por las características del sustrato donde se forma. En el caso de los materiales extruidos va a ser sobre superficies formadas por una mayor densidad de planos compactos, los cuales favorecen una mejor unión entre el sustrato y la capa que otros planos no compactos, como ocurre en los materiales ECAPeados. Además, el aumento de porosidad interna en el material provoca que a medida que avanza la corrosión, el medio penetre más rápido en el interior del material, formándose una capa de hidróxido muy irregular con menor carácter protector.

5.2.1.1. Caracterización de la interfase Composite - $Mg(OH)_2$

Se estudiaron secciones transversales de muestras de todos los materiales mediante microscopía SEM. Para ello previamente se secaron y embutieron en resina epoxi, se cortaron y pulieron a espejo.

La figura 5.18 muestra la interfase entre la zona del material sin corroer (izquierda) y la zona corroída (derecha) de una muestra de L-15HAP. Los resultados del análisis mediante EDX muestran en la parte sin corroer las fases esperadas de Mg e HAP, mientras que, en la parte corroída se observa la fase de hidróxido con partículas de HAP en su interior.

La interfase no es continua, observándose grietas a lo largo de la misma e incluso algunos huecos muy grandes dentro de la fase de $Mg(OH)_2$ debido a la mala unión entre las propias partículas de $Mg(OH)_2$ generadas.

Durante los experimentos se podía observar que los precipitados de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ que se formaban eran muy pequeños y rodeaban las muestras formando una suspensión con el propio medio. Al secar las muestras, el $\text{Mg}(\text{OH})_2$ formado en la superficie de las muestras tenía un aspecto terroso.

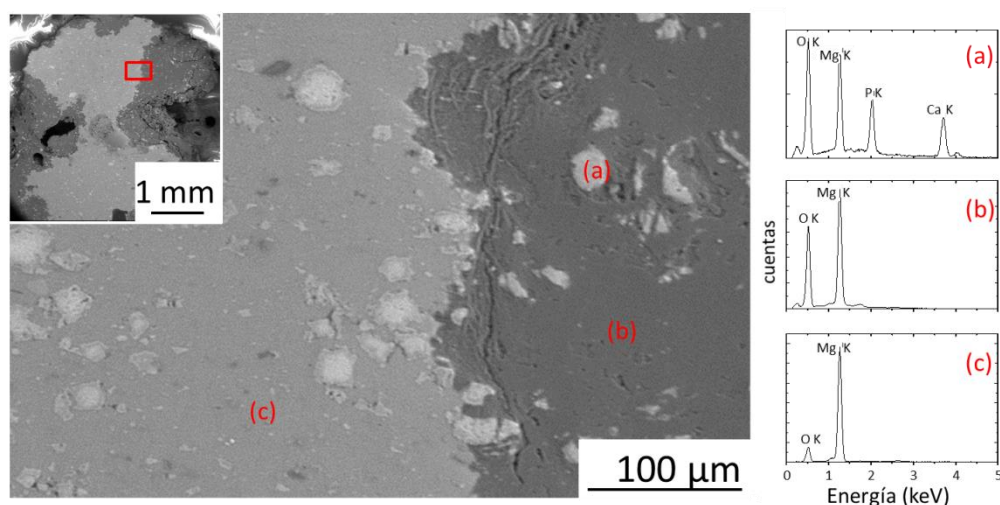


Figura 5.18. Imagen de SEM (BSE) de la interfase en una muestra de L-15HAP corroída 100h en PBS. Se muestra el espectro EDX en varias zonas.

Después de estos experimentos de corrosión, los medios de PBS utilizados se filtraron y los polvos filtrados se estudiaron mediante difracción de rayos-X. En la figura 5.19 se puede observar el difractograma, donde se identifican picos correspondientes a la fase $\text{Mg}(\text{OH})_2$, los cuales se han nombrado con las familias de planos ($h k l$), y a la fase HAP.

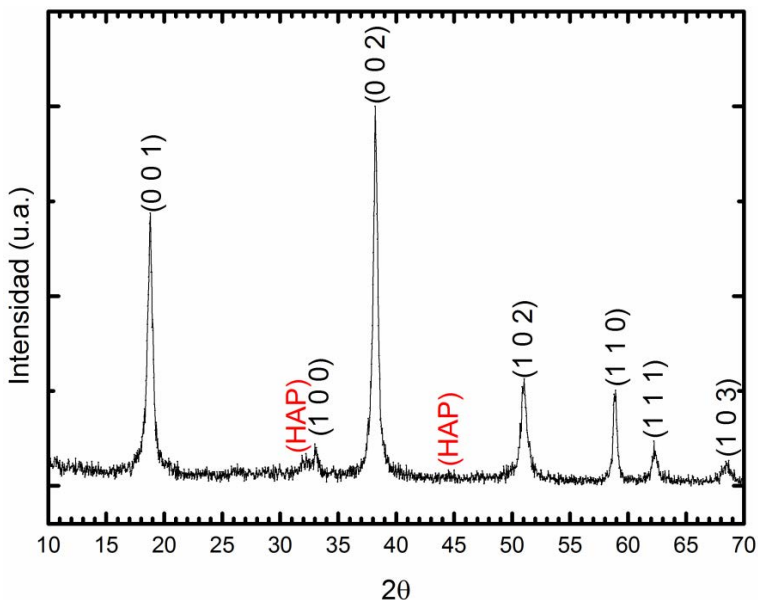


Figura 5.19. Difractograma de rayos-X de los productos de corrosión filtrados del medio después de corroer una muestra de L-15HAP en PBS durante 100 h.

Los picos correspondientes a familias de planos de la fase $\text{Mg}(\text{OH})_2$ son mucho más intensos que los correspondientes a la HAP, lo que indica que el contenido de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ es mucho mayor que el de HAP. Además, estos picos son muy anchos lo que correspondería con un tamaño de *crystallite* muy pequeño, lo que parece coherente, dado que su cristalinidad debe ser baja debido a como se ha producido. Las partículas de HAP se mantienen estables dentro de la fase de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ y el encontrarlas en los filtrados significa que algunas partículas de HAP se desprendían del material tras corroerse el Mg que las rodea.

Una vez terminados los ensayos, las muestras utilizadas se limpiaron para observar su superficie. Para eliminar los restos de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ se sumergieron durante 10 min en una disolución de CrO_3 con $\text{Ag}(\text{NO}_3)_3$ (Inoue, y otros 2002). En la figura 5.20 se pueden observar las consecuencias de la

corrosión en dos muestras de S-15HAP y otras dos muestras de L-15HAP. El área y volumen inicial de todas las muestras fue la misma.

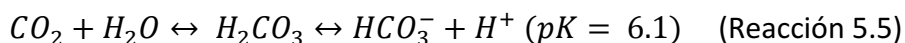


Figura 5.20. Dos muestras de S-15HAP (izquierda) y L-15HAP (derecha) después de 100 horas en PBS.

5.2.2. Electrolitos basados en medios de cultivo celulares

Se utilizaron tres medios de cultivo celulares, que corresponden con los utilizados en los ensayos de citotoxicidad para células de tipo: fibroblasto, osteoblasto y osteoclasto cuyos resultados se recogen en el capítulo 6. Son electrolitos complejos puesto que contienen una gran cantidad de iones y compuestos orgánicos. Su composición se ha detallado en la sección 2.5.2.1.

En estos electrolitos el tampón bicarbonato es el que regula el pH. En el cuerpo humano este tampón se regula mediante la reacción 5.5:



El bicarbonato, principalmente de sodio ($NaHCO_3$), es producido por órganos como el páncreas, mientras que el CO_2 se produce durante el

proceso de respiración. El control de la producción tanto de uno como de otro permite al organismo estabilizar el pH.

El pH fisiológico es 7.4, lo que supone que la concentración de base es 20 veces mayor que la de ácido. Los medios utilizados tienen una concentración de NaHCO_3 en torno a 25 mM y están formulados para funcionar como tampón en atmósferas con una proporción de gas CO_2 del 5%. Estas son las condiciones de las incubadoras que se utilizaron para los experimentos de citotoxicidad. Sin embargo, los experimentos de corrosión se realizaron sin ese suministro de CO_2 , con lo que se perdió la capacidad de tampón del medio y se registraron aumentos del pH.

Los ensayos se realizaron durante 48 h para los materiales S-Mg, S-10HAP y L-10HAP puesto que son los que presentaron mejores resultados en los ensayos de biocompatibilidad.

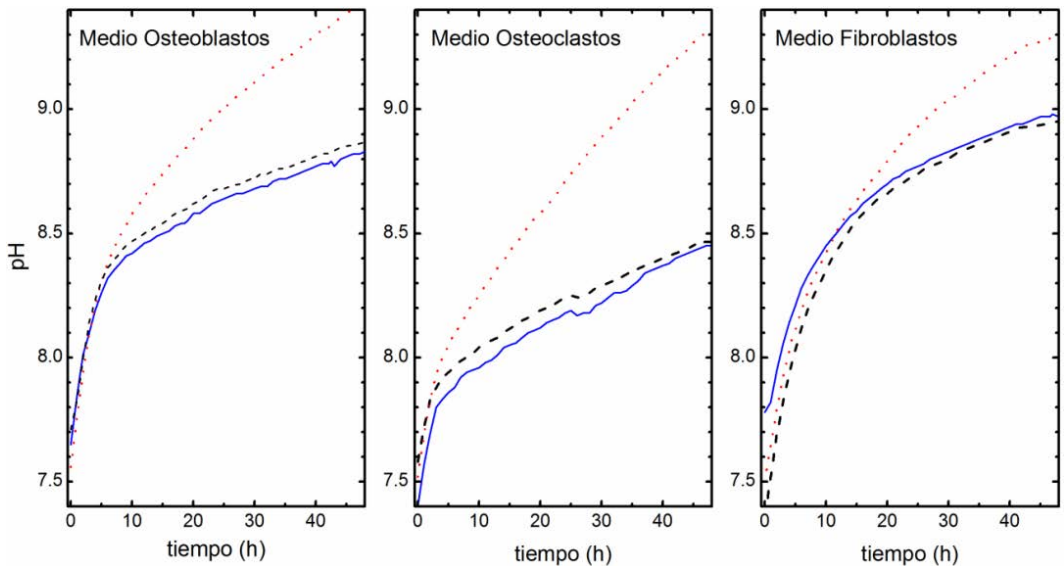


Figura 5.21. Evolución del pH de la solución en función del tiempo para S-Mg (—), S-10HAP (---) y L-10HAP (.....).

La figura 5.21 muestra la evolución del pH de la solución para los tres materiales inmersos en cada uno de los medios. Se observa que S-Mg y S-10HAP tienen un comportamiento similar con independencia del medio utilizado. El mayor aumento del pH se observa en los tres casos para L-10HAP. La disminución del ritmo de aumento de pH está relacionada con la precipitación de hidróxido de Mg como ocurría en PBS, aunque en este medio también podría haber precipitación de carbonato de Mg, ya que poseen una solubilidad parecida.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior, de la medida del volumen de H_2 producido durante el ensayo se calcularon los valores de la velocidad de corrosión. Los resultados se recogen en la figura 5.22.

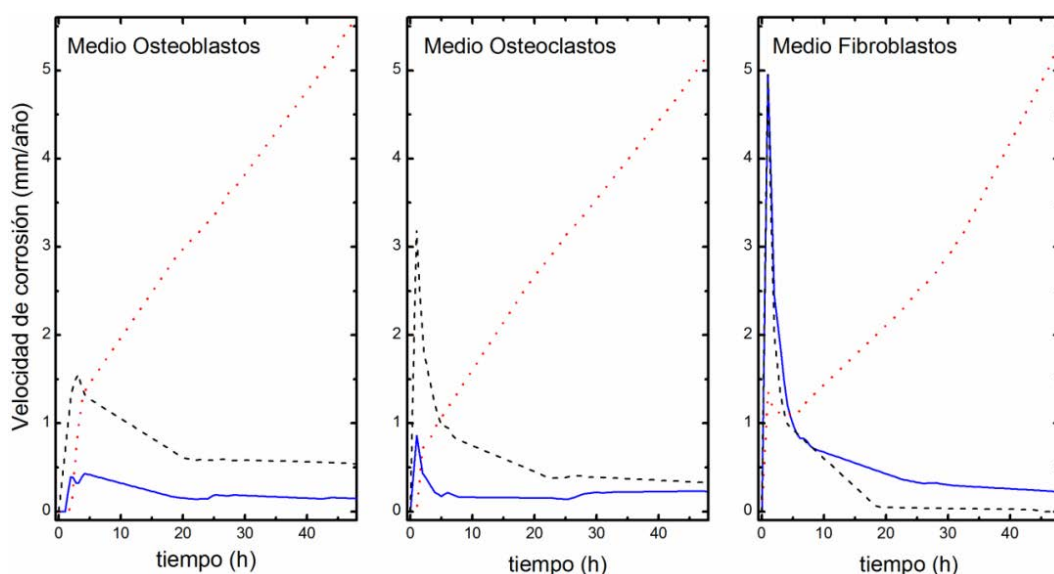


Figura 5.22. Velocidad de corrosión en función del tiempo en los medios para S-Mg (—), S-10HAP (— —) y L-10HAP (.....).

Los resultados de velocidad de corrosión muestran tendencias similares a los encontrados con el PBS pero con diferentes valores, ya que los medios tienen la misma naturaleza pero diferente composición. Tampoco se observan diferencias significativas para cada material en los 3 medios utilizados, aun teniendo composiciones distintas.

Al igual que con los ensayos en PBS, existen dos zonas bien diferenciadas, una para los tiempos iniciales, donde son importantes los efectos superficiales de las muestras y la velocidad de corrosión tiene un ritmo elevado, y otra zona para tiempos posteriores, donde se produce la corrosión característica del material, en la que influyen factores como la densificación del material, la textura o la estabilidad de la capa de hidróxido, como ya se ha visto en el apartado anterior.

En el caso de los materiales S-xHAP (S-Mg y S-10HAP) su comportamiento es similar entre ellos. Pasado el tiempo inicial, la velocidad de corrosión se estabiliza a valores por debajo de 1 mm/año, lo cual está relacionado con la estabilidad de la capa de hidróxido sobre los planos compactos que estos materiales exponen al medio. En estos medios se necesitan tiempos menores para estabilizar la velocidad de corrosión que con PBS, debido a que el aumento de pH en estas condiciones ayuda a la formación de la capa de hidróxido.

Por otro lado, la velocidad de corrosión del material L-10HAP después de la fase inicial continúa aumentando a un ritmo aproximadamente constante; esto está relacionado con la cantidad de poros existentes en el material, que impide la estabilidad del hidróxido y permite la continuación de la corrosión.

Capítulo 6: Citotoxicidad y Formación de ***Biofilms***

6.1. Ensayos de Viabilidad metabólica

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron según la norma ISO 10993 “Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad *in vitro*”. Para la evaluación de dispositivos biodegradables, esta norma recomienda realizar el estudio *in vitro* de la citotoxicidad en células en contacto con los productos resultado de la corrosión de los materiales en los medios de cultivo celulares.

Los ensayos se realizaron para los materiales extruidos L-xHAP y S-xHAP, con 3 tipos de células diferentes: fibroblastos (L-929, ATCC CCL-1), osteoblastos (MC3T3-E1, ATCC CRL-2593) y osteoclastos, según el procedimiento descrito en el capítulo 2.6.2.

Por un lado, se hicieron ensayos de citotoxicidad con células del tipo fibroblasto, puesto que son células esenciales encargadas de la síntesis de las fibras del tejido conjuntivo. Por otro lado, como las aplicaciones potenciales de estos materiales son los implantes temporales óseos, se realizaron los ensayos en las mismas condiciones para células de tipo osteoblasto. Los osteoblastos son las células encargadas de formar hueso y por lo tanto son este tipo de células con las que el futuro implante debería interactuar en un primer momento. A medida que el tejido óseo va madurando, se transforma en un tejido celular más complejo formado por células de tipo osteoclasto. Los osteoclastos son células que se encargan de degradar y reabsorber hueso y trabajan en conjunto con los osteoblastos, manteniendo los huesos en un continuo equilibrio de disolución y formación dentro del cuerpo. De ahí que también se llevaran a cabo experimentos de biocompatibilidad con osteoclastos, que se obtuvieron mediante diferenciación celular de los propios osteoblastos. Los ensayos de citotoxicidad de los osteoclastos se realizaron únicamente con los materiales que presentaban mejores propiedades de biocompatibilidad con las células de tipo osteoblasto y fibroblasto.

Siguiendo la norma, los materiales se tuvieron 24 horas en contacto con el medio celular en una incubadora a 37 °C y atmósfera de 5% de CO₂.

Se utilizó una relación de 1.25 cm² de superficie de material en contacto por cada ml de medio. Pasado ese tiempo se observaron en la superficie de los materiales los primeros efectos de la corrosión. Los medios de cultivo, que llevan aditivos que se colorean con el cambio de pH, también mostraban cambios de color. En los materiales con velocidades de corrosión elevadas se observaba la formación de Mg(OH)₂ en la superficie de la muestra y los medios presentaban una coloración morada, indicando un mayor valor de pH.

Los extractos formados se filtraron y se diluyeron con medio que se había mantenido en las mismas condiciones de temperatura y atmósfera en proporciones 100%, 50%, 25% y 12.5% en volumen de extractos.

Al mismo tiempo que se ponían los materiales en contacto con los medios, se sembraron células en una concentración de 6000 células por pozo en platos de 96 pozos. Estas células se incubaron durante 24 horas a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO₂; posteriormente se sustituyó el medio por los extractos y sus diluciones, incubándose en las condiciones anteriores por otro periodo de 24 horas.

Las células de tipo osteoclasto se obtuvieron por diferenciación a partir de los osteoblastos utilizando un medio enriquecido en ácido L-ascórbico y fosfatos durante un periodo de 10 días. Para ello se sembraron osteoblastos en concentración de 600 células por pozo, asegurándonos que tras 10 días se produjese la diferenciación y tener una concentración adecuada de células al realizar los ensayos.

El análisis de los resultados de los experimentos se basa en la estimación del número de células que sobreviven en cada uno de los medios y condiciones a las que se exponen. Las células vivas tienen la capacidad de convertir el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol) de color amarillo en un producto denominado formazán, de color morado. Las células muertas pierden la habilidad de convertir el MTT en formazán. Por tanto, el número de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán presente. La cantidad de formazán

producido se estimó a partir de los valores de la densidad óptica a la longitud de onda de 570 nm mediante técnicas de espectrofotometría.

La densidad óptica medida se compara con la medida en condiciones que se toman como control. La densidad óptica del control corresponde con el 100% de viabilidad metabólica. Como control se usaron células en la misma concentración inmersas en medio celular, sin extractos. Para tener en cuenta las posibles reacciones de los componentes de los medios con el MTT, que pueden producir compuestos que absorban en 570 nm, se realizaron blancos. La densidad óptica de los blancos se restó de la medida tanto en los experimentos realizados con extractos como en los experimentos usados como control.

En las figura 6.1 y 6.2 se pueden observar los valores de viabilidad metabólica obtenidos para las células de tipo osteoblasto y fibroblasto en diferentes concentraciones de extractos de los distintos materiales, una vez restados los blancos y comparados con los controles. Los materiales S-xHAP se representan con símbolos vacíos y los L-xHAP con símbolos rellenos. El mismo porcentaje de HAP se representa con la misma figura geométrica. Así: S-Mg (\square); S-5HAP (\circ); S-10HAP (\triangle); S-15HAP (\diamond); L-Mg (\blacksquare); L-5HAP (\bullet); L-10HAP (\blacktriangle); L-15HAP (\blacklozenge).

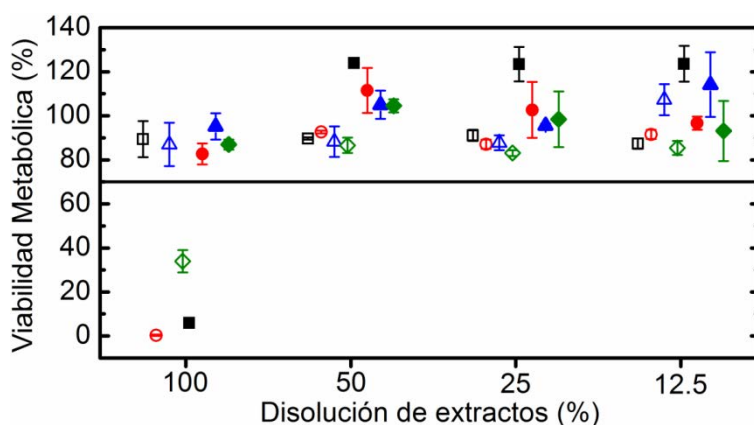


Figura 6.1. Viabilidad Metabólica de los osteoblastos en contacto durante 24 horas con los extractos de los materiales.

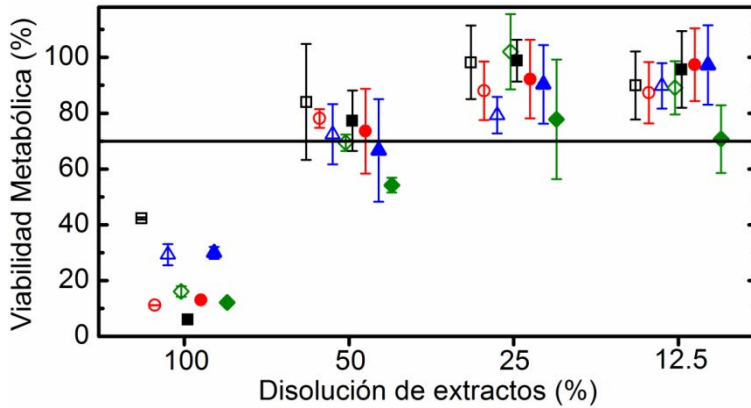


Figura 6.2. Viabilidad Metabólica de los fibroblastos en contacto durante 24 horas con los extractos de los materiales.

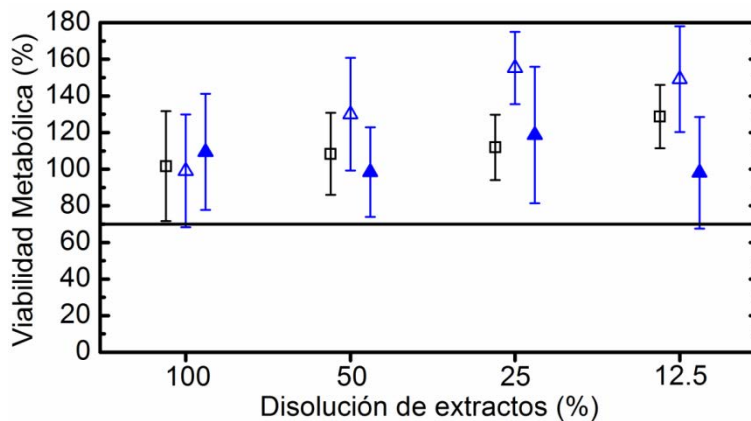


Figura 6.3. Viabilidad Metabólica de los osteoclastos en contacto durante 24 horas con los extractos de los materiales S-Mg, S-10HAP y L-10HAP.

Según la norma ISO, es necesario al menos un 70% de viabilidad metabólica para considerar que el material no es tóxico. Se observa que al diluir los extractos, la viabilidad metabólica aumenta. Esto es lo esperable,

pues al diluir los extractos, las células se encuentran en un medio más parecido al óptimo.

En el caso de las células de tipo osteoblasto (Figura 6.1), sólo tres materiales pueden considerarse tóxicos con sus extractos al 100% de concentración: L-Mg, S-5HAP y S-15HAP. A diluciones del 50% ningún material puede considerarse como tóxico. Para los fibroblastos, los extractos al 100% de todos los materiales son tóxicos (Figura 6.2). Al igual que ocurre con los osteoblastos, al diluir los extractos la viabilidad metabólica aumenta. Para diluciones del 50% sólo L-15HAP es tóxico, y ningún material presenta toxicidad para diluciones iguales o menores a 25%.

Los ensayos de viabilidad con osteoclastos se realizaron únicamente con los materiales para los que se habían obtenido los mejores resultados con los fibroblastos y los osteoblastos en contacto con los extractos al 100%. Estos materiales fueron S-Mg, S-10HAP y L-10HAP. La figura 6.3 muestra que para los tres materiales y todas las diluciones de extractos la viabilidad metabólica está muy por encima del 70%. En la figura 6.4 se compara la viabilidad metabólica de los materiales S-Mg, S-10HAP y L-10HAP con los osteoblastos y osteoclastos. Se observa que, para los materiales S-Mg y S-10HAP la viabilidad metabólica de los osteoblastos es algo inferior que para los osteoclastos. En cambio, para el material L-10HAP podría considerarse que la viabilidad es la misma, en torno al 100%, para las diferentes concentraciones de extractos.

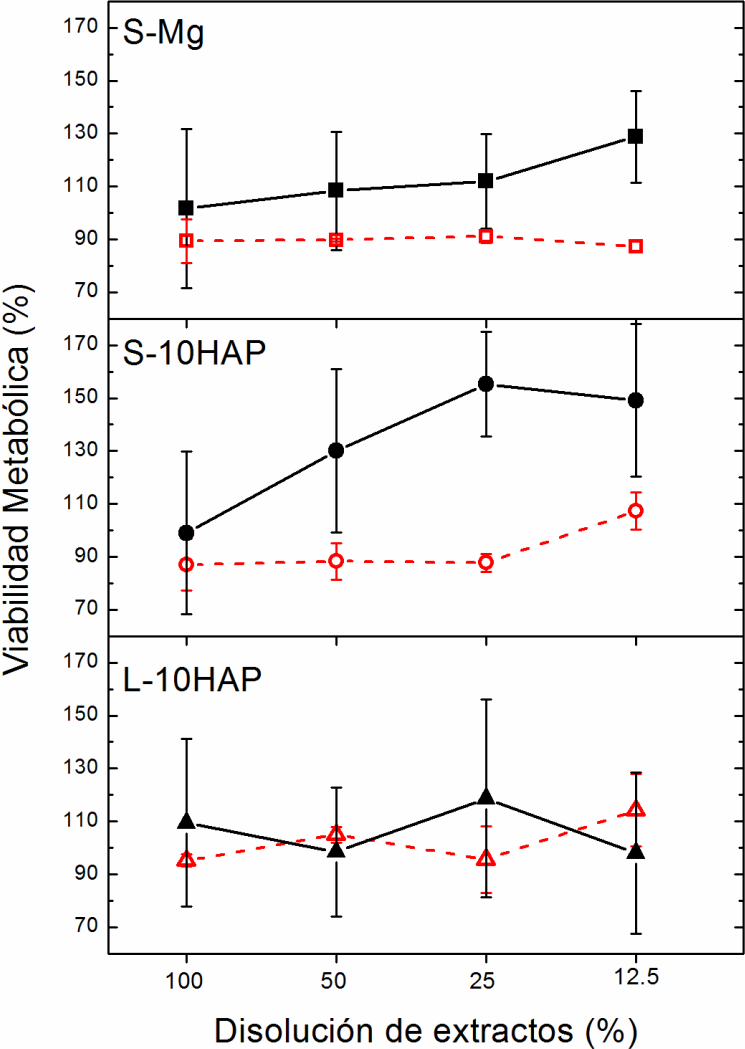


Figura 6.4. Comparación de la viabilidad metabólica de los 3 materiales más biocompatibles con células de tipo osteoblasto y osteoclasto. En negro osteoclastos y en rojo osteoblastos.

6.2. Morfología de las células

Puesto que las células que estarían en contacto directo con los implantes serían los osteoblastos, se obtuvieron imágenes de microscopía confocal de estas células tras permanecer en contacto con los extractos sin diluir (al 100%) durante 24 horas. Los osteoblastos se sembraron en concentración de 30000 células por pozo sobre discos de cristal, en platos de 24 pozos.

Pasadas 24 horas de incubación a 37 °C y en atmósfera de 5% CO₂ se cambiaron los medios por los extractos al 100% y se incubaron en las mismas condiciones durante otras 24 horas. Pasado este tiempo se efectuó el marcaje fluorescente del citoesqueleto con reactivo Alexa 568 Phalloidin, y el de los núcleos con DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol).

Los resultados obtenidos a partir de las imágenes observadas mediante microscopía confocal son coherentes con los valores de viabilidad metabólica obtenidos a partir de los ensayos de citotoxicidad para los extractos al 100%. Con los extractos obtenidos con los materiales más tóxicos se observan células aisladas con formas irregulares. También se observa que cuanto mayor es la viabilidad metabólica mayor es el número de células vivas, y sus formas son más redondeadas y mejor definidas. En la figura 6.5 se pueden observar osteoblastos después de estar 24 horas en contacto con los extractos de los materiales S-10HAP (Figura 6.5a) y S-5HAP (Figura 6.5b); los citoesqueletos están marcados en rojo y en azul los núcleos. El S-10HAP es un ejemplo de material biocompatible puesto que se distinguen núcleos homogéneos y esféricos, correspondientes a células saludables, con citoesqueletos entrelazados. Por el contrario, para el material S-5HAP se observan células aisladas, sin conexión, con formas muy irregulares tanto para el citoesqueleto como para los núcleos, síntomas de toxicidad.

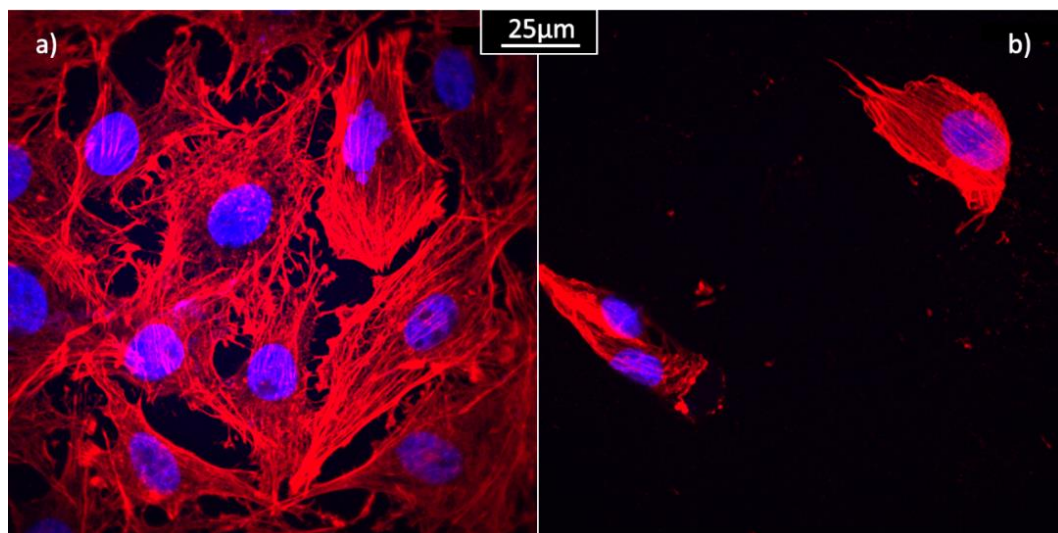


Figura 6.5. Imagen de microscopía confocal de núcleos (azul) y citoesqueletos (rojo) de osteoblastos después de estar 24 horas en contacto con extractos al 100% de a) S-10HAP y b) S-5HAP.

La adherencia y forma de las células en contacto directo con los materiales se analizó mediante FE-SEM. Para ello, en platos de 24 pozos, se sembraron células de tipo osteoblasto sobre los materiales sumergidos en medio celular, y se mantuvieron durante 24 h en condiciones de 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente se fijaron con 2.5% de glutaraldehído y 4% de p-formaldehído durante 2 horas. A continuación se postfijaron con 1% de tetraóxido de osmio a oscuras, tras lo cual se efectuó un lavado con PBS y agua. La deshidratación se realizó a temperatura ambiente con diferentes etanoles en varias concentraciones. Para poder observar las muestras en el microscopio se cubrieron con una capa de carbón mediante sputtering.

En la figura 6.6 se distingue una célula adherida a la superficie de una muestra de S-10HAP. Uno de los problemas observados fue que al poner en contacto los materiales con los medios de cultivo se generan diferentes productos de corrosión (ver capítulo 5.2.2), que se depositan en

la superficie formando diversas capas y estructuras, como se observa en la imagen. Las tensiones que se generan entre ellas pueden originar grietas, que con el proceso de deshidratación pueden propagarse, rompiéndose las uniones de las células con el material.

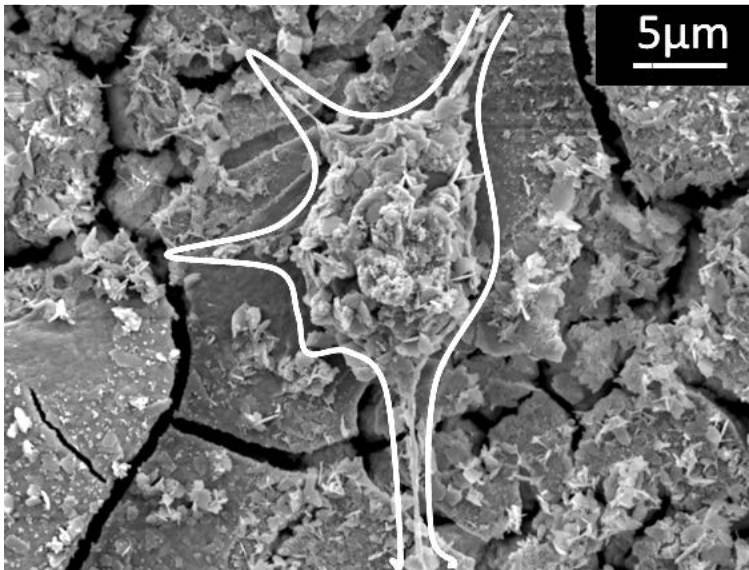


Figura 6.6. Imagen de FE-SEM del detalle de un osteoblasto adherido a la superficie de una muestra de material S-10HAP.

6.3. Formación de *Biofilms*

El estudio de la formación de *biofilms* en los materiales se realizó únicamente con los materiales más prometedores según los resultados de citotoxicidad. Estos fueron S-Mg, S-10HAP y L-10HAP.

Se estudió la formación de *biofilms* con dos bacterias de la especie *Staphylococcus Aureus*: una bacteria de referencia comercial (ATCC 12600

T) la cual se va a denominar como MRSA-1 y otra bacteria, aislada clínicamente, que se denominará MRSA-2. Como ya se comentó en el capítulo 2.7.1, estas bacterias son responsables de la mayoría de infecciones postoperatorias además de resistir a antibióticos.

Los experimentos se llevaron a cabo en platos de 24 pozos. Los materiales se incubaron con medio de osteoclastos y bacterias en concentración de 10^7 CFU/ml a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente se tomaron alícuotas de 10 μ l de los medios para analizar la evolución de las bacterias libres, las que no forman *biofilms*, y a los materiales se les realizó el marcaje de los *biofilms* adheridos a su superficie con cristal violeta. El cristal violeta que reaccionó con los *biofilms* se disolvió en etanol y se midió la densidad óptica a $\lambda = 570$ nm. Al igual que en los ensayos de citotoxicidad, los resultados se compararon con los encontrados en controles. Como superficies de control se usaron las bases de los pozos. Hay que señalar que en este caso los controles son de carácter negativo, es decir se espera en ellos que las bacterias no formen *biofilms*. En el caso de los ensayos en los materiales, los valores de densidad óptica se normalizaron al área inicial de las muestras, y en el caso de los ensayos en los controles al área de los pozos.

Los resultados de la formación de *biofilms* se muestran en la figura 6.7, donde se observa que la bacteria MRSA-1 tiene mayor capacidad de formación de *biofilms* en los controles que la MRSA-2, con un grado de significación estadística $p=0.0009$. Por el contrario, este comportamiento se invierte en los materiales, siendo mayor la capacidad de formación de *biofilms* de la bacteria MRSA-2 que de la MRSA-1, aunque estadísticamente la diferencia no es significativa ($p=0.07$). En cuanto a cada tipo de material no existen diferencias sustanciales con los dos tipos de bacterias ($p \geq 0.016$). Comparando los controles con los materiales, para la MRSA-1 no hay diferencias entre ambos, pero en el caso de la MRSA-2 sí que hay diferencia entre el control y los materiales S-Mg y L-10HAP ($p=0.016$).

Aunque la formación de *biofilms* va a depender del tipo de bacteria, a partir de los experimentos realizados se puede concluir que el material S-10HAP es el menos propenso a formar *biofilms* de MRSA en su superficie.

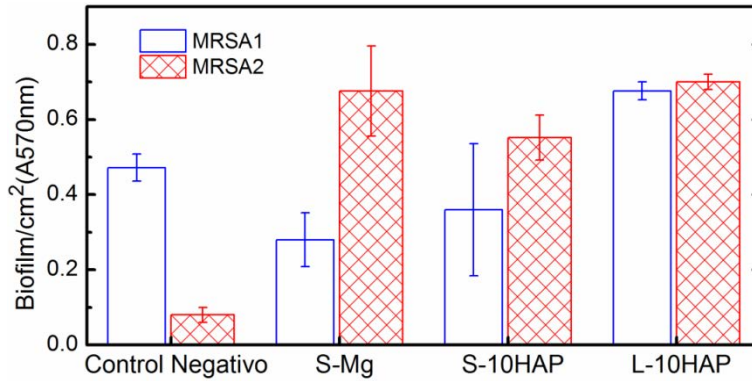


Figura 6.7. Biofilms formadas por área en los materiales y controles.

A partir de las alícuotas del medio con las bacterias libres que fueron recogidas antes de realizar el marcaje de los materiales, se realizaron disoluciones con medio conservado en las mismas condiciones en proporciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 en volumen. A partir de las disoluciones, se sembraron 10 μ l en placas Petri con agar y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para permitir el crecimiento bacteriano. Las colonias crecidas se contaron manualmente mediante una lupa y los resultados se muestran en la Figura 6.8.

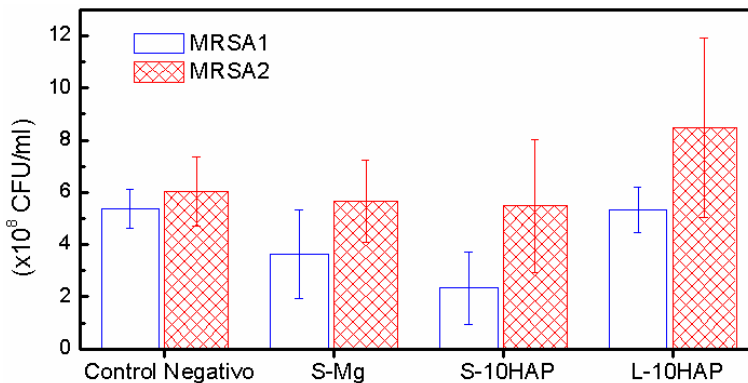


Figura 6.8. Colonias de bacterias libres.

Se puede observar que el crecimiento de colonias en el control es igual para ambos tipos de bacterias mientras que para los materiales se observa un ligero efecto antibacteriano en el tipo de bacteria MRSA-1. Entre los materiales, el S-10HAP es el que mayor efecto antibacteriano presenta.

De los estudios de formación de *biofilms* y de proliferación de bacterias libres se puede determinar que el tipo de bacteria es el factor principal para la formación de *biofilms* (Smith, y otros 2008), más que el propio material, aunque el composite S-10HAP es el menos propenso a la formación de estos *biofilms*. Además este material tiene un carácter antibacteriano impidiendo la reproducción de estas bacterias.

La presencia de Mg^{2+} y el aumento de pH pueden inhibir el crecimiento de las bacterias (Robinson, y otros 2010), incluso estos iones junto con iones Ca^{2+} pueden formar membranas activas con agentes bactericidas contra la especie *Staphylococcus Aureus* (Xie y Yang 2016). Por otro lado, diferentes tipos de hidróxido de magnesio y la diferente naturaleza de sus precursores pueden dar lugar a diferentes comportamientos en el crecimiento de bacterias (Pan, y otros 2013).

Estos factores, además de los inherentes al proceso inicial de adhesión a la superficie para la formación de *biofilms* y su crecimiento hacen este estudio complejo. Además los mecanismos de formación de los *biofilms* y la habilidad para su formación dependen no sólo de la especie de bacteria, sino también de la clase de bacteria dentro de la misma especie (Robinson, y otros 2010).

Capítulo 7: Conclusiones

En esta memoria se presenta el proceso de fabricación y la caracterización microestructural, mecánica, de resistencia a la corrosión y de citotoxicidad, de materiales compuestos de matriz de Mg con refuerzo de partículas de hidroxiapatita producidos mediante ruta pulvimetalúrgica. La compactación se ha realizado mediante la técnica de CIP a 250 MPa y la consolidación ha sido mediante extrusión convencional a 400 °C. Se han seguido diferentes estrategias para modificar la microestructura, y por consiguiente sus propiedades y aplicaciones:

- Variación de las proporciones de HAP en 0, 5, 10 y 15% en peso (x=5, 10 y 15)
- Uso de dos tamaños medios diferentes de partículas de HAP:
 - Tamaño medio de partícula de 25 μm , no estequiométrica (L-xHAP). Velocidad de extrusión y reducción de área de 2 mm/s y 11:1.
 - Tamaño medio de partícula de 6 μm , estequiométrica (S-xHAP). Velocidad de extrusión y reducción de área de 0.5 mm/s y 10:1.
- Aplicación en los materiales L-xHAP de un tratamiento termomecánico mediante la técnica de ECAP siguiendo una ruta B_C, 4 pasadas a 300 °C y velocidad de 0.5 mm/s (LE-xHAP).

Los materiales extruidos se han obtenido en forma de barras largas de 10 mm de diámetro y los materiales modificados por ECAP se han obtenido en forma de barras de 8 mm de diámetro y 120 mm de longitud.

Las conclusiones más relevantes de este estudio son las siguientes:

- Los materiales L-xHAP son los más porosos. Su densificación disminuye con el aumento de contenido en HAP. La familia S-xHAP tiene grados de densificación más altos aunque también se observa aumento de la porosidad con el aumento de contenido en HAP. Los materiales LE-xHAP poseen las mayores densificaciones independientemente del contenido en partículas de HAP.

- Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se ha observado en los materiales L-xHAP porosidad asociada a la interfase entre la matriz y las partículas de L-HAP, la cual es eliminada mediante el proceso de ECAP y es muy reducida para los S-xHAP. Este hecho corrobora los valores de densidad obtenidos.

- La microestructura de todos los materiales consiste en granos de magnesio con forma alargada a la dirección de extrusión. Los granos poseen una relación longitud/anchura más elevada, en torno a 6, en los materiales extruidos que en los ECAPeados, cuyo valor está en torno a 2. Las partículas de HAP se encuentran dispersadas homogéneamente en la matriz de Mg, y se ha encontrado una tercera fase de MgO en forma de partículas embebidas en la matriz, la cual está en mayor contenido en los materiales L-xHAP y LE-xHAP que en los S-xHAP.

- El proceso de extrusión en el Mg crea una textura de fibra, con una ordenación de planos atómicos en la que los planos prismáticos de la celda hexagonal se colocan perpendiculares a la dirección de extrusión y los planos basales paralelos. Para los LE-xHAP existe la rotación de esos planos prismáticos a 30° dejando una mayoría de los planos $(1\ 1\ \bar{2}\ 0)$ perpendiculares a la dirección de extrusión. El índice de textura disminuye con la incorporación de partículas de HAP, aunque la reducción más drástica de este índice se produce con el proceso de ECAP.

- La incorporación de partículas de HAP, en general mejora las propiedades mecánicas de los materiales, aumenta su microdureza, el *yield strength*, la deformación plástica uniforme y la UCS, aunque en el caso de la UCS al aumentar el contenido de HAP en los materiales con L-HAP, disminuye. El procesado ECAP aumenta sensiblemente el *yield strength* y reduce los valores de UCS. Se ha observado el fenómeno de *texture hardening*, encontrándose una relación lineal entre la velocidad de endurecimiento y el inverso del índice de textura.

- Se ha estudiado la resistencia a la corrosión en medio salino, en PBS y en medios de cultivo celulares. Se ha determinado que los factores principales que afectan a la corrosión son la porosidad interna, la textura y

el porcentaje de partículas de HAP, siendo el primero de ellos el más determinante y perjudicial. Aunque se ha encontrado que la introducción de partículas de HAP aumenta la resistencia a la corrosión, la morfología de las partículas afecta a la porosidad del material, por lo que debe ser tenida en cuenta. La textura de fibra de los materiales extruidos favorece su resistencia a la corrosión, puesto que expone al medio un mayor porcentaje de planos compactos. Así se determina que la familia de materiales L-xHAP tiene una velocidad alta-media de corrosión, dominada por la porosidad asociada a las partículas de L-HAP; la familia LE-xHAP una velocidad de corrosión media, cuyo valor depende del porcentaje de partículas de L-HAP; y la familia S-xHAP una velocidad baja puesto que aúna una densificación alta y una textura adecuada.

- Mediante los ensayos de citotoxicidad con células de tipo osteoblasto y fibroblasto se determinó que los materiales L-10HAP, S-Mg y S-10HAP eran los más biocompatibles. En estos tres materiales se realizaron también estudios de citotoxicidad con células de tipo osteoclasto encontrándose los siguientes resultados: a) en los materiales S-10HAP y S-Mg la viabilidad metabólica es más alta para los osteoclastos que para los osteoblastos para todas las diluciones de extractos y b) en el material L-10HAP las viabilidades metabólicas de ambos tipos de células son similares, lo que puede ayudar a que en presencia de este material ambas células trabajen más coordinadas.

- Los estudios de formación de *biofilms* con la bacteria *Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus* han revelado una menor tendencia a formar estos *biofilms* por parte del material S-10HAP.

Por lo tanto los materiales más idóneos para usarse como implantes temporales biodegradables serían de la familia de materiales S-xHAP puesto que presentan mayor resistencia a la corrosión y, por tanto, darían durante mayor tiempo estabilidad al implante, así como buena biocompatibilidad para recuperar el tejido. Además se observó que para toda esa familia el pH no variaba después de encontrarse hasta 100 horas sumergido. Estas

características permiten que no se acumulen en el tejido demasiadas burbujas de H_2 y no haya altas diferencias de pH en el cuerpo, además de no enriquecer el entorno con iones Mg^{2+} y productos de corrosión. Dentro de esta familia los ensayos de citotoxicidad indican biocompatibilidad para los materiales S-Mg y S-10HAP y menor capacidad de formación de *biofilms* en el material S-10HAP.

Por todo ello, el material S-10HAP parece el candidato más prometedor para realizar estas aplicaciones y el material con el que continuar futuras investigaciones en este campo.

7.1. Trabajo Futuro

Además de continuar con investigaciones con el material S-10HAP, el estudio de biocompatibilidad y formación de *biofilms* con los materiales LE-xHAP resultaría muy enriquecedor para este trabajo.

Otra línea a continuar sería estudiar materiales con proporciones bimodales entre los dos tipos de partículas de HAP. Puesto que el implante temporal debería ajustarse a las condiciones de cada paciente, sería necesario el estudio de más variedad de velocidades de corrosión, que podría conseguirse variando las proporciones de los diferentes tipos de HAP.

Puesto que la relación entre la textura y la resistencia a la corrosión en estos materiales se encuentra relacionada se podrían aplicar diferentes tratamientos termo-mecánicos, bien mediante rutas alternativas o bien con diferente número de pasadas.

Referencias

- Argade, G. R., S. K. Panigrahi, y R. S. Mishra. «Effects of grain size on the corrosion resistance of wrought magnesium alloys containing neodymium.» *Corrosion science* 58, 2012: 145-151.
- Asri, R. I. M., W. S. W. Harun, M. A. Hassan, S. A. C. Ghani, y Z. Buyong. «A review of hydroxyapatite-based coating techniques: Sol-gel and electrochemical depositions on biocompatible metals.» *Journal of mechanical behavior of biomedical materials*, 57, 2016: 95-108.
- Atrens, A., G. L. Song, F. Cao, Z. Shi, y P. K. Bowen. «Advances in Mg corrosion and research suggestions.» *Journal of magnesium and alloys* 1, 2013: 177-200.
- Aung, N. N., y W. Zhou. «Effect of grain size and twins on corrosion behaviour of AZ31B magnesium alloy.» *Corrosion science* 52, 2010: 589-594.
- Barnett, M. R., Z. Keshavarz, A. G. Beer, y D. Atwell. «Influence of grain size on the compressive deformation of wrought Mg-3Al-1Zn.» *Acta materialia* 52, 2004: 5093-5103.
- Boucher, H. W., y otros. «Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America.» *Clinical infectious diseases* 48, 2009: 1-12.
- Cáceres, C. H., y A. H. Blake. «On the strain hardening behaviour of magnesium at room temperature.» *Materials science and engineering A* 462, 2007: 193-196.
- Cáceres, C. H., y P. Lukac. «Strain hardening behaviour and the Taylor factor of pure magnesium.» *Philosophical magazine* 88, 2008: 977-989.

- Chaudhuri, B., B. Mondal, S. K. Ray, y S. C. Sarkar. «A novel biocompatible conducting polyvinyl alcohol (PVA)- polyvinylpyrrolidone (PVP)-hydroxyapatite (HAP) composite scaffolds for probable biological application.» *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 143, 2016: 71-80.
- Chen, Q., y G. A. Thouas. «Metallic implant biomaterials.» *Materials science and engineering R* 87, 2015: 1-57.
- Chou, J. T., H. Shimauchi, K. I. Ikeda, F. Yoshida, y H. Nakashima. «Preparation of samples using a chemical etching for SEM/EBSP method in a pure magnesium polycrystal and analysis of its twin boundaries.» *Journal of Japan institute of light metals* 55, 2005: 131-136.
- Deng, K. K., X. J. Wang, Y. W. Wu, X. S. Hu, K. Wu, y W. M. Gan. «Effect of particle size on microstructure and mechanical properties of SiCp/AZ91 magnesium matrix composite.» *Materials science and engineering A* 543, 2012: 158-163.
- Dobrzanski, L. A., A. Wlodarczyk, y M. Adamiak. «Structure, properties and corrosion resistance of PM composite materials based on EN AW-2124 aluminium alloy reinforced with the Al₂O₃ ceramic particles.» *Journal of materials processing technology* 162-163, 2005: 27-32.
- Elias, C. N., J. H. C. Lima, R. Valiev, y M. A. Meyers. «Biomedical applications of titanium and its alloys.» *The journal of the minerals, metals & materials society (TMS)* 60, 2008: 46-49.
- Ferrasse, S., V. M. Segal, S. R. Kalidindi, y F. Alford. «Texture evolution during equal channel angular extrusion: Part I. Effect of route, number of passes and initial texture.» *Materials science and engineering A* 368, 2004: 28-40.
- Furukawa, M., Y. Iwahashi, Z. Horita, M. Nemoto, y T. G. Langdon. «The shearing characteristics associated with equal-channel angular pressing.» *Materials science and engineering A* 257, 1998: 328-332.

- Hall, E. O. «The deformation and ageing of mild steel: III. Discussion of results.» *Proceedings of the physical society*, 64, 1951: 747-753.
- Inoue, H., K. Sugahara, A. Yamamoto, y H. Tsubakino. «Corrosion rate of magnesium and its alloys in buffered chloride solutions.» *Corrosion science* 44, 2002: 603-610.
- Kocks, U. F., y H. Mecking. «Physics and phenomenology of strain hardening: the FCC case.» *Progress in materials science* 48, 2003: 171-273.
- Lin, H. K., J. C. Huang, y T. G. Langdon. «Relationship between texture and low temperature superplasticity in an extruded AZ31 Mg alloy processed by ECAP.» *Materials science and engineering A* 402, 2005: 250-257.
- Litynska-Dobrzynka, L., y otros. «Characterization of aluminium matrix composites reinforced by Al-Cu-Fe quasicrystalline particles.» *Journal of alloys and compounds* 643, 2015: 114-118.
- Liu, M., D. Qiu, M. C. Zhao, G. Song, y A. Atrens. «The effect of crystallographic orientation on the active corrosion of pure magnesium.» *Scripta materialia* 58, 2008: 421-424.
- Mackenzie, L. W. F., y M. Pekguleryuz. «The influences of alloying additions and processing parameters on the rolling microstructures and textures of magnesium alloys.» *Materials science and engineering A* 480, 2008: 189-197.
- Madl, A. K., M. Liong, M. Kovochich, B. L. Finley, D. J. Paustenbach, y G. Oberdörster. «Toxicology of wear particles of cobalt-chromium alloy metal-on-metal hip implants. Part I: Physicochemical properties in patient and simulator studies.» *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine* 11, 2015: 1201-1215.
- Olszta, M. J., y otros. «Bone structure and formation: A new perspective.» *Materials science and engineering R* 58, 2007: 77-116.

- Orlovskii, V. P., V. S. Komlev, y S. M. Barinov. «Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics.» *Inorganic materials* 38, 2002: 973-984.
- Pan, X., y otros. «Investigation of antibacterial activity and related mechanism of a series of nano-Mg(OH)₂.» *Applied materials & interfaces* 5, 2013: 1137-1142.
- Parente, P., B. Savoini, B. Ferrari, M. A. Monge, R. Pareja, y A. J. Sanchez-Herencia. «Effect of highly dispersed yttria addition on thermal stability of hydroxyapatite.» *Materials science and engineering C* 33, 2013: 864-869.
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, H. A. Benink, T. J. Worzella, y L. Minor. *Cell viability assays*. Bethesda (Maryland): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2013.
- Robinson, D. A., R. W. Griffith, D. Schechtman, R. B. Evans, y M. G. Conzemius. «In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.» *Acta biomaterialia* 6, 2010: 1869-1877.
- Rodriguez-Carvajal, J. «Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction.» *Physica B: Condensed matter* 192, 1993: 55-69.
- Rossi, A. L., y otros. «Ultrastructure of regenerated bone mineral surrounding hydroxyapatite-alginate composite and sintered hydroxyapatite.» *Bone* 50, 2012: 301-310.
- Sarker, D., J. Friedman, y D. L. Chen. «De-twinning and texture change in an extruded AM30 magnesium alloy during compression along normal direction.» *Journal of materials science & technology* 31, 2015: 264-268.

- Sarker, D., y D. L. Chen. «Detwinning and strain hardening of an extruded magnesium alloy during compression.» *Scripta materialia* 67, 2012: 165-168.
- Sarker, D., y D. L. Chen. «Texture transformation in an extruded magnesium alloy under pressure.» *Materials science and engineering A* 582, 2013: 63-67.
- Segal, V. M. «Equal channel angular extrusion: from macromechanics to structure formation.» *Materials science and engineering A* 271, 1999: 322-333.
- Shi, Z., y A. Atrens. «An innovative specimen configuration for the study of Mg corrosion.» *Corrosion science* 53, 2011: 226-246.
- Smith, K., A. Perez, G. Ramage, D. Lappin, C. G. Gemmell, y S. Lang. «Biofilm formation by Scottish clinical isolates of Staphylococcus Aureus.» *Journal of medical microbiology* 57, 2008: 1018-1023.
- Society, The materials Information. *ASM Handbook volume 9: Metallography and Microstructures*. ASM International, 2004.
- Song, D., A. Ma, J. Jiang, P. Lin, D. Yang, y J. Fan. «Corrosion behavior of equal-channel-angular- pressed pure magnesium in NaCl aqueous solution.» *Corrosion science* 52, 2010: 481-490.
- Song, G. L., R. Mishra, y Z. Q. Xu. «Crystallographic orientation and electrochemical activity of AZ31 Mg alloy.» *Electrochemistry communications* 12, 2010: 1009-1012.
- Song, G. L., y K. A. Unocic. «The anodic surface film and hydrogen evolution on Mg.» *Corrosion science* 98, 2015: 758-765.
- Song, G., y A. Atrens. «Understanding magnesium corrosion-A framework for improved alloy performance.» *Advanced engineering materials* 5, 2003: 837-858.

- Sturcken, E. F., y J. W. Croach. «Predicting physical properties in oriented metals.» *Transactions of the metallurgical society of aime* 227, 1963: 934-940.
- Taheri, M., R. C. Phillips, J. R. Kish, y G. A. Botton. «Analysis of the surface film formed on Mg by exposure to water using a FIB cross-section and STEM-EDS.» *Corrosion science* 59, 2012: 222-228.
- Tan, Q., A. Atrens, N. Mo, y M. X. Zhang. «Oxidation of magnesium alloys at elevated temperatures in air: A review.» *Corrosion science* 112, 2016: 734-759.
- Tiwari, B. L., y J. J. Bommarito. «A novel technique to evaluate the corrosion behavior of magnesium alloys.» *Proceeding - Magnesium technology 2002*, 2002.
- Torres, Y., P. Trueba, J. Pavon, I. Montealegre, y J. A. Rodriguez-Ortiz. «Designing, processing and characterisation of titanium cylinders with graded porosity: An alternative to stress-shielding solutions.» *Materials & design* 63, 2014: 316-324.
- Wang, D., K. Christensen, K. Chawla, G. Xiao, P. H. Krebsbach, y R. T. Franceschi. «Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential.» *Journal of bone and mineral research* 14, 1999: 893-903.
- Wang, Y. N., y J. C. Huang. «The role of twinning and untwinning in yielding behavior in hot-extruded Mg-Al-Zn alloy.» *Acta materialia* 55, 2007: 897-905.
- Witte, F. «The history of biodegradable magnesium implants: A review.» *Acta biomaterialia* 6, 2010: 1680-1692.
- Xie, Y., y L. Yang. «Calcium and magnesium ions are membrane-active against stationary-phase *Staphylococcus Aureus* with high specificity.» *Scientific reports* 6, 2016: 20628-20636.

- Xin, R., B. Li, L. Li, y Q. Liu. «Influence of texture on corrosion rate of AZ31 Mg alloy in 3.5wt.% NaCl.» *Materials & design* 32, 2011: 4548-4552.
- Zysset, P. K., X. E. Guo, C. E. Hoffler, K. E. Moore, y S. A. Goldstein. «Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur.» *Journal of biomechanics* 32, 1999: 1005-1012.